



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

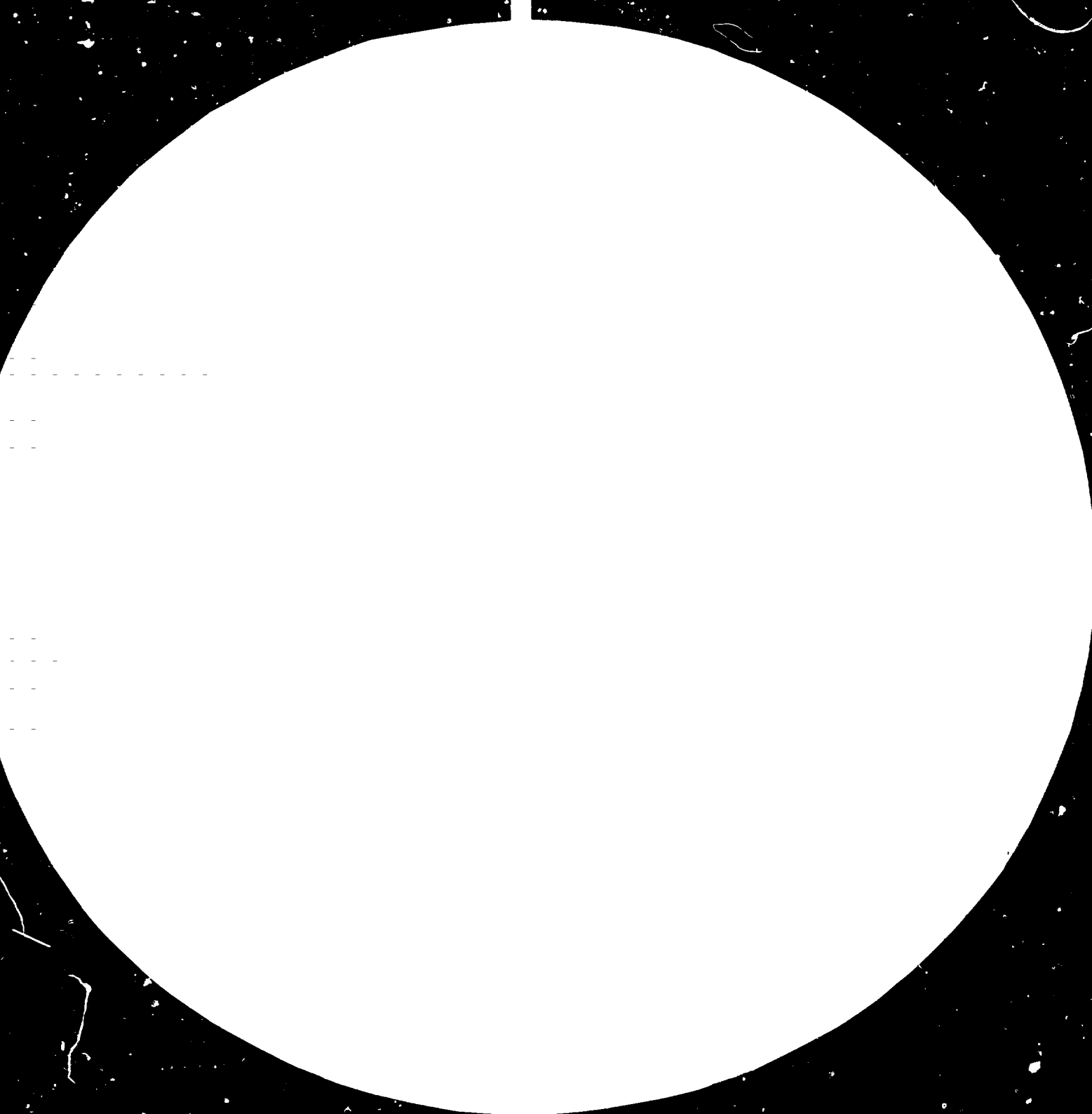
FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

CONTACT

Please contact publications@unido.org for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org





2.8



3.2



3.6



4.0



MP-1000 COPY RESOLUTION TEST CHART

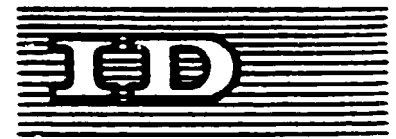
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS-1963-A

U.S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE: 1963 O - 358-101

100% RELATIVE HUMIDITY, 20°C (68°F)



11730-F



Distr. LIMITEE

ID/WG.382/2/Add.2
20 septembre 1982

Organisation des Nations Unies pour le développement industriel

FRANCAIS
Original: ANGLAIS

Réunion de haut niveau sur l'établissement
d'un Centre international pour le génie
génétique et la biotechnologie

Belgrade (Yougoslavie), 13 - 17 décembre 1982

APPLICATION DU GENIE GENETIQUE A LA PRODUCTION
D'ENERGIE ET A LA PRODUCTION D'ENGRAIS A
PARTIR DE LA BIOMASSE*

Préparé par
Ray Wu**

* Les opinions exprimées dans le présent document sont celles de l'auteur et ne reflètent pas nécessairement celles du Secrétariat de l'ONU. Traduction d'un document n'ayant pas fait l'objet d'une mise au point rédactionnelle.

** Professeur, Département de biochimie, Université Cornell, Wing Hall, Ithaca, N.Y. 14853, Etats-Unis d'Amérique.

Table des matières

	<u>Page</u>
A(1). <u>Contexte et justificatif</u>	1
1. <u>Matières cellulosiques</u>	1
2. <u>Cellulases</u>	2
3. <u>Micro-organismes cellulolytiques</u>	2 - 3
B(1). <u>Activités</u>	3
1. <u>Analyse de cellulases d'organismes cellulolytiques</u>	3 - 4
2. <u>Clonage de gènes de cellulase et production de mutants favorables par mutagénèse in vitro</u>	4
3. <u>Clonage de gènes de cellulase fongique et introduction de ceux-ci dans des levures</u>	4 - 5
4. <u>Clonage de gènes de cellulase bactérienne et introduction dans Zymomonas mobilis</u>	5 - 6
5. <u>Clonage de gènes d'isomérase du xylose et introduction dans S. pombe</u>	6 - 9
PRODUCTION D'ENGRAIS A PARTIR DE SYSTEMES BIOLOGIQUES	
A(2). <u>Contexte et justificatif</u>	10
B(2). <u>Activités</u>	11 - 13
1. <u>Utilisation du génie génétique pour modifier Thiobium et d'autres micro-organismes afin de fixer plus d'azote pour l'amélioration du rendement des récoltes</u>	13 - 14
2. <u>Utilisation de micro-organismes libres pour l'amélioration du rendement des récoltes</u>	14
C(2). <u>Plan de travail</u>	15
D(2). <u>Collaboration avec d'autres institutions</u>	16
E(2). <u>Préalables</u>	16
F(2). <u>Besoins financiers</u>	16
- <u>Budget quinquennal</u>	17
ANNEXE I	
<u>Besoins en équipement</u>	18 - 19
<u>Références pour le carburant liquide à partir de la biomasse</u>	20 - 21
<u>Bibliographie - Projet de fixation d'azote</u>	22

A(1). Contexte et justificatif

A la lumière des problèmes croissants de pénurie de carburant et des gaspillages occasionnés par son recyclage il est nécessaire d'établir une utilisation et une conversion efficaces de ressources énergétiques renouvelables (comme des matières cellulosiques et des déchets) en carburants liquides. Cette procédure nous permettra de remplacer, partiellement du moins, notre besoin de quantités croissantes d'une matière non renouvelable comme le pétrole dont l'offre s'épuise.

L'apport du génie génétique dans la solution de ce problème mondial est essentiel. Il représente en effet un vaste ensemble de disciplines parmi lesquelles on notera la biochimie, la microbiologie, la génétique et la technologie de l'ADN recombinant.

1. Matières cellulosiques. La cellulose et l'hémicellulose sont les ressources renouvelables les plus abondantes de la nature. Avec la lignine ces produits constituent près de 95% du poids sec de déchets des plantes. La production mondiale de déchets cellulosiques excède quatre milliards de tonnes par an (1). Si les matières cellulosiques peuvent être efficacement transformées en éthanol, une gigantesque source de combustible liquide sera disponible. Du point de vue technique, le processus est relativement simple; hydrolyse de cellulose en glucose et transformation subséquente en éthanol. Ce procédé fut utilisé pour la première fois à grande échelle pour la production d'éthanol au cours de la première guerre mondiale et pendant la deuxième guerre mondiale, il fut ensuite amélioré dans l'immédiat après-guerre. En raison du faible rendement du procédé et les problèmes de corrosion dus à l'acide catalyseur utilisé pour scinder les matières cellulosiques, le procédé n'était pas très rentable du point de vue économique par rapport aux autres méthodes de production de carburant à partir de pétrole. Cependant, la crise de l'énergie toute récente et l'épuisement rapide des réserves de pétrole, conjointement au développement de l'hydrolyse enzymatique microbienne de la cellulose a graduellement inversé cette situation. Grâce à l'application du génie génétique et de la biotechnologie on peut espérer que la transformation de matières cellulosiques en éthanol deviendra économiquement rentable.

2. Cellulases. Les principaux composants des cellulases furent isolés à partir de filtrats de cultures de nombreux organismes comme Trichoderma reesei, le système le mieux étudié. Grâce à l'utilisation de procédés chromatographiques, les cellulases ont été purifiées jusqu'à l'homogénéité (2). Celles-ci comptent:

- (a) 1,4- β -glucano glucanohydrolase (également connu sous le nom d'endo-glucanase), CMCase- transforme la cellulose amorphe en fibres libres.
- (b) 1,4- β -glucan cellobiohydrolase (également connue sous le nom d'exo-glucanase, exocellulase, avicellase) - transforme du papier filtre ou avicelle en cellulose par un mode d'attaque terminal. Il s'agit d'une enzyme décrystallisante. La cellobiose est un inhibiteur intéressant.
- (c) β -glucosidase (également connue sous le nom de cellobiase)- transforme la cellobiose (aussi possible avec la cellotriose et la cellotetrose) en glucose. Le glucose agit comme inhibiteur non concurrent. Haute inhibition de substrat apparente à de très hauts degrés de concentration de substrats. C'est la moins stable des trois cellulases et est celle qui se trouve en plus faibles quantités dans T. reesei.

3. Micro-organismes cellulolytiques. De nombreux micro-organismes contiennent des cellulases. Un certain nombre d'entre-eux ont été étudiés récemment (3):

- (a) bactéries
 - Cellfibro fulvus, cellvibro vulgaris - aérobie - mésophile;
 - Cellulomonas - aérobie - mésophile;
 - Pseudomonas fluorescens - aérobie- mésophile;
 - Clostridium thermocellulaseum - anaérobie - thermophile.
- (b) Actinomycètes (aérobies)
 - Streptomycès QMB814
 - Thermoactinomycète; thermomonospora curvata
 - Thermomonospora fusca
- (c) Fongus (aérobies)
 - Aspergillus niger
 - Trametes sanguinea; Poria; Pestalotiopsis westerdijkii

Penicillium iriensis QM9624; Penicillium funiculosum;
Polyporus versicola; Polyporus tulipiferae;
Fusarium solani; sporotrichum pulverulentum QM9145
Trichoderma reesei (viride)
Trichoderma lignorum; Trichoderma konigii
Thermoascus aurantiacus QM9383

Etant donné que la biomasse se compose de près de 45 pourcent de cellulose, 30 pourcent d'hémicellulose et 20 pourcent de lignine, le thème central et l'objectif majeur de ce programme de travail sera la conversion efficace de cellulose et d'hémicellulose en éthanol. Plusieurs approches différentes peuvent être adoptées pour atteindre cet objectif. Nous nous limiterons à l'étude de deux des méthodes les plus importantes:

- (a) Utilisation de micro-organismes génétiquement manipulés;
- (b) Utilisation de la technologie de l'ADN recombinant, particulièrement pour le clonage moléculaire et l'amplification de gènes de cellulases.

B(1). Activités

Un certain nombre de problèmes fondamentaux et techniques doivent être résolus si l'on désire parvenir à une conversion efficace de cellulose et de l'hémicellulose en éthanol. Il est évident que plusieurs problèmes différents devront être abordés en parallèle. Une grande partie de ce programme de travail impliquera des travaux de recherche fondamentale puisque un grand nombre de points essentiels concernant ces systèmes complexes doivent encore être établis.

1. Analyse de cellulases d'organismes cellulolytiques. Trois cellulases parmi une variété d'organismes cellulolytiques connus seront étudiés; en l'occurrence l'endoglucanase, l'exoglucanase et la cellobiase (voir section A(1)). Ces organismes seront étudiés afin de déterminer la quantité excrétée en milieu extracellulaire et dans les cellules pour B-glucosidase (ex; unités/ml), l'activité spécifique d'enzymes purifiés et non purifiés (unités/mg protéine), la stabilité, le degré d'inhibition du produit ou du substrat, etc. D'autres micro-organismes devraient être examinés afin de trouver de nouvelles sources de cellulases.

Une fois que des sources de cellulases adaptées auront été trouvées, la quantité ou la qualité des enzymes pourront probablement être améliorées grâce à l'application de méthodes de mutation génétique, comme celles utilisées pour choisir les Trichoderma reesei mutants AM9414, MCG77, MCG80 favorables (4).

2. Clonage des gènes de cellulase et production de mutants favorables par mutagenèse in vitro. Une approche adaptée pour la recherche au CIGGB peut être le clonage de gènes de cellulase d'organismes cellulolytiques analysés dans la section précédente. Cette opération peut se faire soit en créant des bibliothèques de génomes de ces organismes ou en créant des cADN de mRNA grâce à l'utilisation des techniques de l'ADN recombinant (5,6). Une fois que les gènes seront clonés dans un plasmide, placés près d'un promoteur puissant et d'une position de lien ribosome forte et, introduits dans E.coli ou B.subtilis par des procédures de transformation (5,6), on prévoit la production à grande échelle de ces cellulases.

L'étape suivante est de procéder à une mutagenèse in vitro sur ces gènes clonés de cellulase, par des changements de paires de base ou par de petites suppressions (7) dans l'espoir de produire des gènes mutants comportant le code de cellulases ayant une plus grande résistance à l'inhibition des produits.

3. Clonage de gènes de cellulase fongique et introduction de ceux-ci dans des levures. Le champignon Trichoderma reesei, produit et évacué de grandes quantités de cellulases qui peuvent dégrader la cellulose en glucose. Les cellules de levure (comme saccharomyces cerevisiae) qui peuvent transformer efficacement du glucose en éthanol ne peuvent pas dégrader la cellulose. Une méthode de recherche adaptée que le CIGGB devrait envisager est la construction d'une souche de levure améliorée; celle-ci contiendrait les gènes des cellulases et pourrait donc excréter des cellulases hors de cellules pour transformer la cellulose en glucose. Cette nouvelle souche devrait ensuite être capable de transformer efficacement de la cellulose en éthanol. La construction de cette souche implique deux étapes. La première consiste en un clonage de gènes pour

les cellulases de Trichoderma reesei (mutant MCG77 ou MCG80) ou d'autres champignons cellulolytiques comme décrit dans la section précédente. Néanmoins, dans ce cas les gènes sont joints à un plasmide de levure (comme le plasmide du type YEp13 qui comporte une séquence Ars et un marqueur aisément sélectionné comme His3 ou LEU2). La deuxième étape consiste en un transfert de gènes de cellulase avec les plasmides de levure dans une levure par transformation (8). Le plasmide sera maintenu dans la levure en cultivant la levure en l'absence de leucine.

Une autre possibilité est de permettre aux gènes de cellulase d'être intégrés de manière stable dans les chromosomes de levure. En supposant que les peptides de signal de Trichoderma reesei soient reconnus par la levure (très probable puisque T. reesei et la levure sont des champignons) les gènes clonés de cellulase devraient incorporer des peptides de signal pour l'excrétion de cellulases dans le milieu. S'ils ne sont pas reconnus par la levure, une autre approche peut être envisagée. Le gène cloné pour le signal peptidique de T. reesei sera ôté à l'aide de procédures d'ADN recombinant standards et l'on n'inclura que les gènes structuraux des cellulases. Ces gènes de cellulases seront joints à un dérivé de YEp13 qui contient également la séquence promotrice et le signal peptidique du gène de l'invertase de la levure. Comme l'invertase de la levure est excrétée, les gènes de cellulase joints à son gène de séquence de signal devraient également être excrétés. L'on a déjà isolé des mutants des levures sur-produisant de l'invertase (9). Si nécessaire, le gène de l'invertase de cette souche sera cloné.

L'avantage de cette approche est que les cellules d'une levure courante comme S. cerevisiae (pour laquelle le système de transformation a été établi, et qui peut être facilement cultivée dans de grandes cuves de fermentation) peuvent alors directement transformer des matières cellulosiques en alcool.

4. Clonage de gènes de cellulase bactérienne et introduction dans Zymomonas mobilis. La bactérie Zymomonas mobilis peut convertir le glucose en éthanol avec les avantages suivants:

- (a) haut rendement spécifique de l'éthanol;
- (b) tolérance aux hautes concentrations de glucose; et
- (c) capacité de croître de manière totalement anaérobie, ainsi l'adjonction d'oxygène au cours de fermentations continues est inutile.

Récemment, Bland et ses collaborateurs (12) a utilisé un réacteur d'immobilisation-de-cellules du type "support de film attaché expansé" (SFAE) (13) et a démontré que la conversion de sucre en éthanol par la bactérie Z. mobilis peut être accrue à 105g/h par rapport au volume total du ferment (12). Bien que le ferment SFAE constitue une manière efficace de transformer du sucre en éthanol grâce à Z. mobilis cette bactérie ne contient pas les gènes de cellulase nécessaires pour transformer la cellulose en glucose.

Des bactéries comme cellulomonas fimi contiennent des gènes de cellulase et secrètent des cellulases qui pénètrent la matrice du bois et attaquent la cellulose de façon extra-cellulaire pour produire des sucres. Une cellulase de C. fimi au moins a été clonée récemment (11). L'étape suivante est de cloner le gène comportant le code des trois cellulases (endo- β 1,4 glucanase, exo β 1,4 glucanase et β -glucosidase) et la séquence de signal de codage peptidique, et de joindre à un plasmide bactérien comme pKC30 (14) à côté d'une séquence forte de promoteur comme décrit dans la section ci-dessus.

Le CIGGB pourrait tenter un projet consistant à transférer les gènes clonés de cellulase bactérienne sur un plasmide comme pKC30 dans Zymomonas mobilis par transformation. Peut-être faut-il tout d'abord établir les procédures de transformation pour introduire des plasmides dans Z. mobilis en faisant appel aux principes et techniques utilisés lors de l'introduction de plasmides étrangers dans E. coli et B. subtilis. Si le plasmide et les gènes de cellulase ne sont pas très stables dans la bactérie, ils peuvent être forcés d'intégrer le chromosome bactérien par recombinaison intégrative. Ce processus est réalisé en clonant d'abord un gène Y de Z. mobilis dans le même plasmide pKC30. Une fois que les gènes de cellulase sont aussi joints à ce plasmide et transforment les cellules; le dérivatif pKC30 complet peut être intégré dans le chromosome de Z. mobilis à la place du gène Y par recombinaison intégrative.

5. Clonage de gènes d'isomérase du xylose et introduction dans S.pombe.

D'importantes concentrations de glucides dérivés de l'hémicellulose peuvent être facilement obtenues grâce à l'utilisation d'acides dilués. Les organismes idéaux pour la conversion de glucides dérivés de la biomasse en des produits comme l'éthanol sont des levures. Cependant, la plupart des levures ne sont pas capables de dégrader des pentoses. La démonstration réus-

sie et récente de la production quantitative d'éthanol (80% du rendement théorique) à partir de D-xylose grâce aux levures et une isomérase du xylose devrait permettre de simplifier les problèmes liés au traitement des pentoses (16).

Une orientation possible pour la recherche est de cloner le gène de l'isomérase du xylose et de l'introduire dans Schizosaccharomyces pombe, une levure plus favorable que la levure de boulanger (S. cerevisiae) lors de la conversion du xylose en éthanol. Cette levure manipulée génétiquement peut alors convertir le xylose en éthanol à haut rendement. Cette souche de levure serait beaucoup plus efficace pour la production d'éthanol que la souche récemment découverte : Pachysolen tannophilus, souche NRRL 2460 (17).

Outre la production d'éthanol, les sous-produits de la dégradation par des micro-organismes d'hémicellulose comportent du méthane, des acides organiques, des alcools sacchariques, des solvants et des aliments pour le bétail. Ainsi, d'autres matières intéressantes peuvent être produites.

En fait, cette partie du programme de travail insiste sur l'utilisation de levures ou bactéries manipulées génétiquement pour la conversion efficace de matières cellulosiques en éthanol. Il est évident que les mêmes levures ou bactéries seraient également utiles pour transformer de la biomasse en aliments (comme des protéines mono-cellulaires) et des produits chimiques industriels comme ceux mentionnés dans le paragraphe précédent.

La composante majeure du programme serait la recherche et le développement; pour cette activité, le travail de recherche serait réalisé par un minimum de quatre groupes travaillant en collaboration étroite. Le premier groupe serait dirigé par un microbiologiste, sa fonction principale serait d'analyser les cellulases de micro-organismes cellulolytiques connus et de rechercher de nouveaux micro-organismes cellulolytiques. Le deuxième groupe, dirigé par un biochimiste, devra purifier les cellulases (sélectionnées par le groupe de microbiologie) et étudier leurs propriétés. Ce groupe entreprendra aussi le travail de clonage de gènes de cellulases. Le troisième groupe, dirigé par un expert en ADN recombinant, aura pour tâche de modifier les gènes de cellulase clonés (par le groupe de biochimie), et de transférer les gènes de cellulase bactérienne clonés dans des cellules de Zymomonas mobilis. Le quatrième groupe, dirigé par un expert des levures, se chargera du transfert des gènes de cellulase de Trichoderma reesei clonés (ou d'autres gènes de cellulase de fungus comme Penicillium funiculosum) dans des cellules

de levure , et établir les conditions pour une conversion optimale de cellulose en glucose et de glucose en éthanol. Chacun de ces quatre groupes comprendra un collaborateur titulaire d'un doctorat et/ou un technicien. Le chef de groupe sera assisté par un scientifique (niveau de la licence). Chaque groupe peut en outre former deux stagiaires, originaires des pays en développement, tous les deux ans.

Deux réunions ou séances de travail seront organisées par ces quatre groupes. Des experts de réputation internationale seront invités pour chaque domaine de travail et de recherche et développement. Les thèmes de discussion comprendront des études sur les micro-organismes et cellulases cellulolytiques, le clonage et l'amplification des gènes des cellulases, le transfert des gènes clonés dans des levures ou bactéries fermentescibles, l'amélioration de l'efficacité de la conversion de cellulose (et d'hémicellulose) en sucre puis en alcool.

Les résultats de ce programme seront produits en plusieurs étapes. La première sera d'identifier les meilleurs cellulases (d'un ou plusieurs micro-organismes cellulolytiques) offrant des cellulases stables ayant une activité spécifique importante (l'endoglucanase et l'exoglucanase devraient être excrétés dans le milieu de croissance). L'étape suivante sera de cloner plusieurs de ces cellulases et de les joindre à des plasmides de bactéries ou de levures. La troisième étape consiste à transférer les cellulases fongiques clonés (comme celle de T. reesei) dans des cellules de levure et de maximiser la conversion directe de cellulose en éthanol dans cette levure recombinante. Des expériences ayant pour but de transférer des cellulases bactériennes clonées (comme celles de cellulomonas fimi) dans Zymomonas mobilis de manière à ce que cette bactérie recombinante puisse directement transformer de la cellulose en éthanol, seront menées en parallèle. Nous prévoyons d'importants progrès; néanmoins l'accomplissement de tout le travail de recherche et de développement serait un but irréaliste. Cependant, même un succès partiel sera important pour finalement résoudre le problème de la conversion efficace et économique de matières cellulosiques en éthanol. Une fois que le travail de R&D de base aura été réalisé, le programme sera transmis au groupe de biotechnologie qui aura pour tâche d'adapter les nouveaux acquis à la production d'éthanol à grande échelle. Des améliorations technologiques considérables dans la récupération et la dessiccation de l'éthanol sont également nécessaires.

Des services de conseil seront offerts aux laboratoires des pays en développement travaillant dans ce domaine.

PRODUCTION D'ENGRAIS A PARTIR DE SYSTEMES BIOLOGIQUES

A(2). Contexte et justificatif

La fixation biologique d'azote est un processus essentiel pour tous les organismes vivants de notre planète. La capacité de réduire l'azote présent dans l'atmosphère en ammoniac n'est donnée qu'à un petit nombre de bactéries, algues bleues-vertes et les actinomycètes. Certains de ces micro-organismes peuvent réduire l'azote atmosphérique sous forme d'azote libre dans Klebsiella, Azotobacter, et dans les algues bleues-vertes. Cependant, les micro-organismes ayant une importance économique réalisent le processus de fixation en association étroite avec des plantes complexes sous forme de symbiose véritable. Au cours de la symbiose la plante cède des glucides essentiels au micro-organisme, celui-ci cède l'azote réduit pour la bactérie et la synthèse protéique de la plante. Le processus anaérobie qu'est la fixation d'azote est réalisée par un complexe d'enzymes nitrogénases, celui-ci étant fortement conservé dans tous les organismes fixant l'azote. Dans le cas de Klebsiella pneumoniae le code du processus est contenu dans un groupe de gènes comportant 17 gènes contigus (trois gènes structuraux) transcrits de manière unidirectionnelle en sept unités transcriptionnelles. La fixation de N_2 Nif opéron requiert la présence constante de la protéine du gène A qui agit comme inducteur. La protéine du gène L agit comme répresseur de l'opéron Nif en régulant la production de la protéine du gène A. Des données récentes de divers laboratoires de recherche indiquent que, non seulement dans Klebsiella mais aussi dans Rhizobia et les algues bleues-vertes, les gènes Nif (de fixation d'azote) sont organisés en groupes de gènes contigus. La régulation du processus de fixation d'azote de Rhizobia n'a pas encore été élucidée à ce jour.

La fixation symbiotique d'azote requiert l'interaction de micro-organismes et de cellules des plantes. La prolifération de la racine, induite par Rhizobia, a pour résultat la formation de nodules dans les légumineuses. A la différence de la formation de galles en couronne, les Rhizobia se trouvent à l'intérieur des cellules de la plante et au cours d'un processus de développement régulé, les Rhizobia deviennent des bactéroïdes réalisant le processus de fixation.

La reconnaissance des plantes, le processus d'infection et la spécificité de l'hôte semblent être incorporés sous forme de groupes de gènes dans le génome bactérien. Des découvertes récentes sur Rhizobium leguminosarum indiquent la présence de gènes de nodulation et de gènes de fixation d'azote

dans un grand plasmide. Lorsque ce plasmide fut transféré à Agrobacterium tumifaciens, des nodules inefficaces non-fixants furent formés après l'injection de racines de pois. De même, les cellules de Rhizobium meliloti contiennent des plasmides plus grands appelés mégaplasmides (taille supérieure à 500 KD). Ces mégaplasmides contiennent également les gènes nécessaires au processus de nodulation étroitement liés au groupe de gènes responsables de la fixation nitrique. Des expériences ayant pour but de transférer la capacité de fixation nitrique de cellules bactériennes dans un système de cellules eucaryotiques par des techniques de génie génétique ont abouti au maintien stable du groupe de gènes Nif dans le chromosome numéro 3 de la levure modifiée; ceci permet de supposer que le remplacement de signaux des gènes Nif bactériens par des signaux de levure ou de plante est requis pour obtenir une expression génique. Des études subséquentes plus détaillées encore seront nécessaires pour comprendre l'assemblage du nitrogénase dans une cellule eukaryotique.

B(2). Activités

Un certain nombre de problèmes fondamentaux et techniques devront être résolus afin de parvenir à la production d'engrais faisant appel à des systèmes biologiques. Nous ne présenterons que deux projets dans ce document. Le travail de recherche devrait être réalisé par une équipe de trois groupes travaillant en collaboration étroite et en collaboration avec les spécialistes en génétique des plantes comme décrit dans le programme d'amélioration des produits agricoles et alimentaires.^{1/} Le premier groupe, dirigé par un biochimiste, fera appel aux méthodes de biochimie pour analyser les systèmes de fixation nitrique et utilisera les techniques de l'ADN recombinant pour cloner et transférer des gènes entre les souches de bactéries fixant l'azote ou entre des bactéries et des plantes. Le troisième groupe dirigé par un expert en plantes et en cellules végétales, étudiera le mécanisme et l'efficacité de la fixation d'azote et les systèmes photosynthétiques dans les plantes. Une fois ces systèmes mieux compris, ce groupe coopérera avec les groupes de microbiologie et de biochimie afin d'utiliser les bactéries fixant l'azote ou pour transférer des bactéries recombinantes dont l'ADN aura été modifié dans des plantes. Il contrôlera le taux de croissance

^{1/} "Amélioration des produits agricoles et alimentaires par le génie génétique et la biotechnologie", ID/WG.382/2/Add.5.

des plantes, le contenu protéique des graines, etc., et tenter de maximiser les rendements.

Chacun de des trois groupes comptera un assistant scientifique au niveau post-doctorat et peut-être un scientifique qui secondera le chef de groupe du programme. Chaque groupe pourrait former deux stagiaires originaires de pays en développement tous les deux ans. En d'autres termes, les trois groupes peuvent former six stagiaires en deux ans ou quinze stagiaires au cours des cinq premières années.

Une réunion annuelle ou groupe de travail mixte rassemblant les trois groupes sera organisée. Les experts de ce domaine de recherche originaires de divers pays seront invités à y participer.

Les services de conseil de plusieurs groupes de recherche les plus importants dans le monde, spécialistes dans ce domaine de la recherche, seront nécessaires. Ces services de conseil comprendront l'invitation de chercheurs actifs au CIGGB pendant plusieurs jours ou plusieurs semaines. Entre trois et six chercheurs seront invités chaque année. Ces services pourraient également comprendre la délégation de plusieurs chercheurs dans de grands centres de recherche mondiaux afin de traiter des problèmes très spécifiques comme ceux ayant trait aux conditions particulières du sol d'une région déterminée ou à des souches de bactéries fixant l'azote et concurrentielles. Ces souches pourraient être ramenées au CIGGB afin de subir des modifications génétiques.

Le but principal de ce programme sera d'améliorer les souches de Rhizobium existantes et de les rendre plus concurrentielles dans leur environnement naturel dans diverses régions du monde. Etant donné que la nature des sols et les bactéries concurrentes dans ces sols seront différentes, des souches de Rhizobium améliorées "sur mesure" devront être créées dans chaque cas. Bien que le principe de la modification génétique soit assez simple, la recherche dans ce domaine requiert énormément de temps et des réalisations majeures au cours des cinq premières années peuvent ne pas voir le jour. D'autre part, même des améliorations mineures dans l'efficacité relative à la fixation nitrique, entraînant une augmentation de rendement des récoltes de dix pourcent auront une incidence économique significative.

De plus, toute recherche fondamentale réalisée au CIGGB amenant à une meilleure compréhension des mécanismes de fixation de l'azote par les bactéries

ou de l'interaction bactérie/plante permettra d'améliorer les rendements des récoltes. Le soja et vigna sinensis constituent l'exemple utilisé dans ce programme de travail. Le principe sous-jacent de ce type de recherche et la technologie élaborée à cette fin peuvent être appliqués à d'autres systèmes.

L'utilisation de micro-organismes libres pour l'amélioration de la productivité des récoltes par l'étude de Pseudomonas et d'algues bleues-vertes fixant l'azote devraient fournir un résultat au cours de cinq premières années.

1. Utilisation du génie génétique pour modifier Thixobium et d'autres micro-organismes afin de fixer plus d'azote pour l'amélioration du rendement des récoltes.

Altération de Rhizobium pour l'amélioration du rendement des récoltes

Les principaux facteurs limitants de la fixation symbiotique de l'azote sont constitués par l'absence de souches de Rhizobium compétitives. Il a été clairement établi que moins de cinq pourcent du Rhizobium inoculé est efficace dans la culture de plantes pour les récoltes. Deuxièmement, il faut des Rhizobia capables de noduler et de fixer l'azote en présence de bactéries fixes dans le sol. Troisièmement, le processus de nodulation et celui de la fixation nitrique sont sensibles à diverses conditions défavorables telles que la sécheresse, le taux de salinité et la chaleur.

Les principales récoltes de légumineuses sont le soja et vigna sinensis. C'est pourquoi un grand effort quant à l'isolation de nouvelles souches provenant du sol et la sélection de souches concurrentielles de Rhizobium japonicum et Rhizobium pour vigna sinensis devrait être consenti. De même, ces souches devraient être adoptées par des cultivateurs régionaux et adaptées aux sols des régions concernées. La technologie de l'ADN recombinant, dès la disponibilité des systèmes de transferts de gènes de Rhizobium, pourrait être utilisée pour combiner les traits favorables du Rhizobium naturel. Outre la création de souches concurrentielles, l'application de la biologie moléculaire à Rhizobium pourrait amener à la création de souches de nodulateurs et fixateurs constitutifs indépendants ou qui ne peuvent pas être inhibés par l'azote contenue dans le sol. Dès la disponibilité de systèmes de transferts de gènes clonés dans les gènes de nodulation de Rhizobia à croissance lente, des gènes de fixation nitrique ou la capacité de surmonter des conditions défavorables devraient être recherchés afin de créer des souches de Rhizobium supérieures.

Il conviendrait d'entreprendre un travail permettant de comprendre la réponse de la plante face à l'infection par les microbes; ce travail ferait appel à la biologie moléculaire. La capacité des micro-organismes à surmonter les mécanismes de défense naturels des plantes peut amener à une infection et nodulation par *Rhizobium* plus efficaces. Des efforts devraient également être entrepris afin de créer des nodules sur d'autres parties de la plante que la racine, la tige ou les feuilles par exemple.

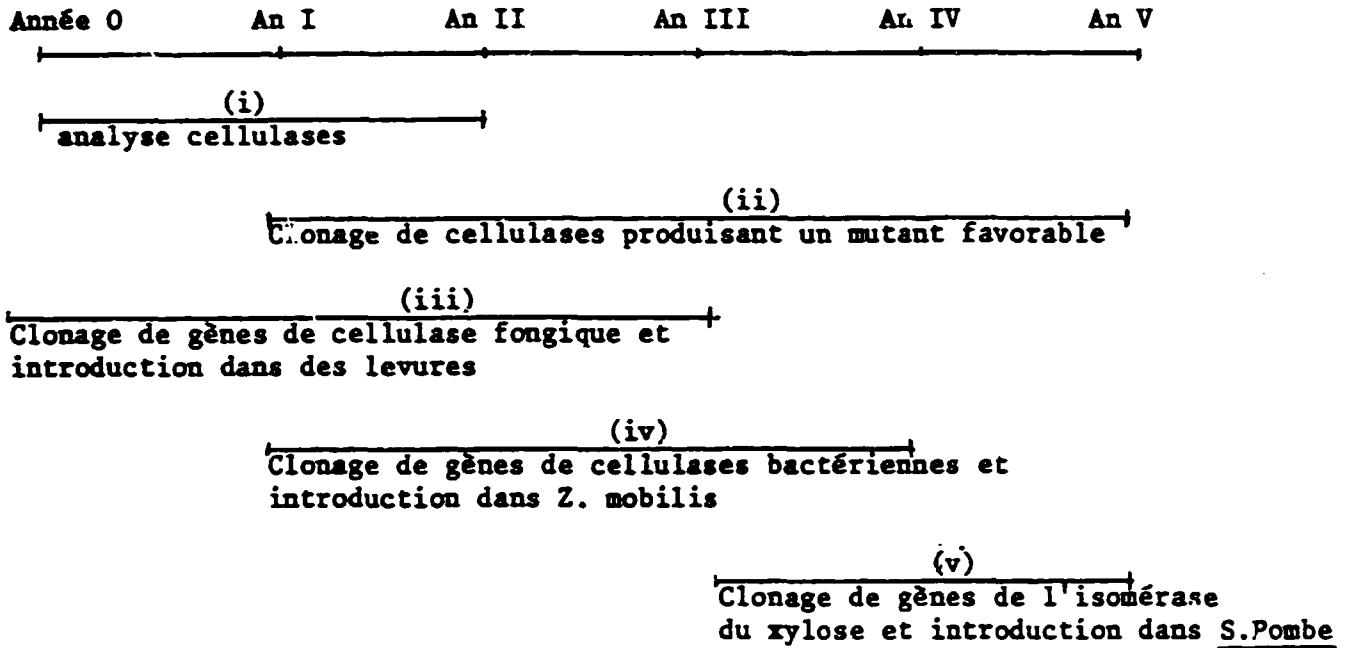
La fourniture d'azote sous forme de nodules sur les tiges ou les feuilles au moment le plus opportun avant la formation des cosses pourrait avoir une incidence économique énorme. En outre, l'interaction entre la photosynthèse et la fixation d'azote devrait être étudiée au niveau de la biologie moléculaire. En résumé, le développement de souches supérieures ainsi qu'une meilleure compréhension du processus d'infection et de la réponse de la plante supérieure pourraient amener à une association optimale plante/microbe et dès lors à une augmentation du rendement des légumineuses. La technologie de l'ADN recombinant peut nous permettre de transférer la capacité de fixation d'azote à d'autres plantes que des légumineuses. Il s'agit d'une recherche fondamentale, celle-ci exigera beaucoup de temps pour être pleinement effectuée.

2. Utilisation de micro-organismes libres pour l'amélioration du rendement des récoltes

Les principales récoltes en dehors des légumineuses sont le maïs, le riz, le blé, etc. Le remplacement d'azote réduit chimiquement par de l'azote fixé biologiquement dans ces plantes est économiquement très important. C'est pourquoi les micro-organismes présents dans le sol comme *Azotobacter*, les *Pseudomonas* fixant l'azote et les algues bleues-vertes devraient faire l'objet de plus d'attention. L'application possible de *Pseudomonas* fixant l'azote au niveau des tiges et des feuilles pourrait devenir aussi important pour la fixation d'azote dans les céréales que ne l'est *Rhizobia* pour l'amélioration du rendement des légumineuses. De plus, le génie génétique appliqué aux micro-organismes présents dans le sol pourrait amener à une meilleure production des récoltes grâce à la création de micro-organismes incapables de causer des maladies ou en altérant des micro-organismes pour qu'ils deviennent des antagonistes naturels d'agents pathogènes et leurs concurrents. Finalement il conviendrait de s'intéresser aux micro-organismes photosynthétiques qui pourraient être adaptés en tant que symbionts sur les feuilles des plantes supérieures; un exemple de ce type d'application est celui de la fougère aquatique (interaction *Azolla*/algue bleue-verte).

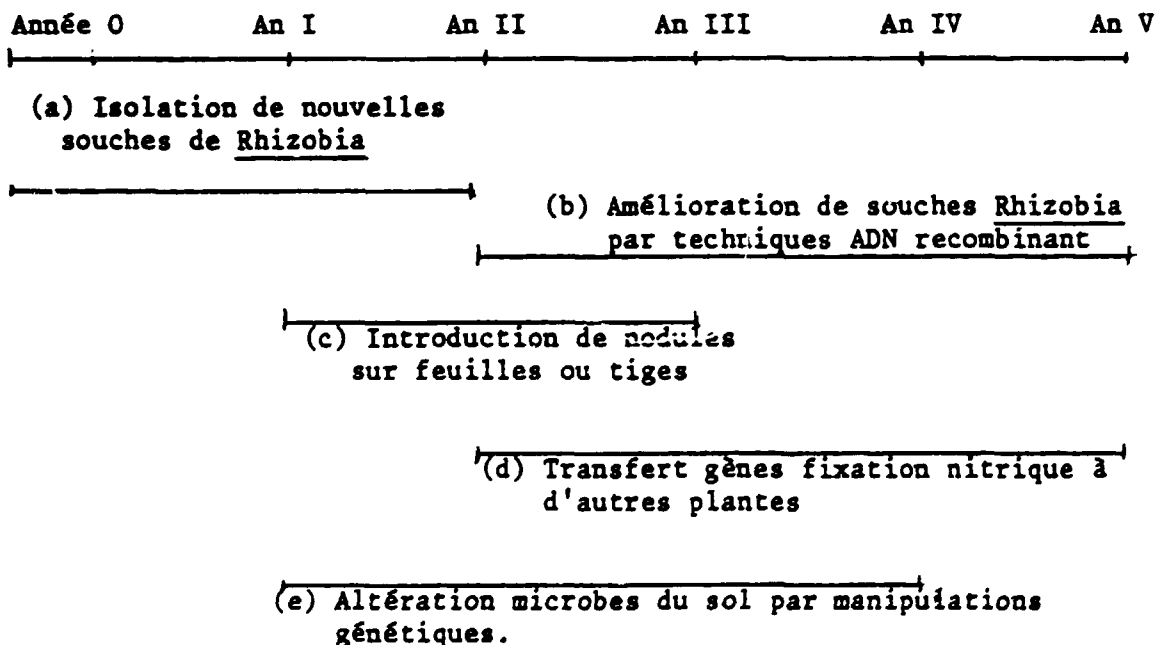
C(2). Plan de travail

Calendrier pour le plan de travail sur la production de carburant à partir de la biomasse:



Calendrier pour le plan de travail sur la production d'engrais par les systèmes biologiques.

Nous prévoyons que certains projets offriront des résultats positifs dans les délais indiqués, d'autres (tels que (b) et (d) peuvent requérir davantage de temps .



D(2). Collaboration avec d'autres institutions

Des relations avec plusieurs grandes institutions de recherche seront nécessaires.

Parmi celles-ci nous prévoyons:

- Laboratoires de recherche avancés;
- Les organisations internationales compétentes comme L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO)
- projets en cours dans ce domaine, par exemple le programme de l'ONUDI sur la Conversion des Déchets agricoles aux Philippines.

E(2). Préalables

Le préalable nécessaire au déroulement satisfaisant du programme est la qualification appropriée des stagiaires. Les stagiaires doivent être titulaires d'un diplôme équivalent à un Ph.D. en biochimie ou en microbiologie. Ils doivent être très motivés et désireux d'apprendre et de travailler sous la supervision des membres scientifiques de l'équipe ou des collaborateurs au niveau post-doctorat du CIGGB.

Dans une première étape, le choix des candidats stagiaires peut être fait par un conseil scientifique dans un pays en développement. Il est impératif que la décision finale soit prise par le personnel scientifique du CIGGB, car les seuls critères de sélection seront les mérites scientifiques.

F(2). Besoins financiers

Lorsque le programme fonctionnera pleinement le personnel suivant sera requis:

- Deux scientifiques confirmés
- Huit scientifiques
- Sept collaborateurs (post-doctorat)
- Huit techniciens

25 stagiaires devraient être engagés dans le cadre de ce programme.

Budget quinquennal

(en milliers de
dollars E.U.)

PERSONNEL

(première année 40%, deuxième année 60%)

Scientifique confirmé	8 hommes/année	600
Scientifique	32 hommes/année	1.440
Collaborateurs (post-doctorat)	28 hommes/année	672
Techniciens	32 hommes/année	<u>544</u>
Sous-total		3.256
Gestion du Centre et personnel auxiliaire		<u>937</u>
Total personnel		4.193

ACTIVITES DE FONCTIONNEMENT

Scientifiques visiteurs	40 hommes/mois	320
Réunions groupes d'experts	4 hommes/mois	100
Services conseils	30 hommes/mois	300
Formation	50 hommes/année	1.125
Matériel d'information		30
Achats produits chimiques, etc.	104 unités-hommes/année	1.040
Associations		150
Divers (voyages, téléphone, etc.)		<u>138</u>
Total activités de fonctionnement		3.203
Total programme de travail		7.396

ANNEXE I

Besoins en équipement

Les besoins en équipement pour ce programme s'établissent comme suit:

- 30 bains-marie et incubateurs
- 20 petits agitateurs rotatifs
- 20 balances (dont une micro et une macro)
- 10 pH mètres
- 20 microcentrifugeuses de table
- 20 microcentrifugeuses réfrigérées
- 10 centrifugeuses de parquet à vitesse moyenne (comme Sorvall RC-5)
- 10 spectrophotomètres
- 30 réfrigérateurs

Les installations de soutien partagées seront composées des éléments suivants:

(a) Salle d'instruments avec:

- 1 compteur de scintillation
- 1 machine à glace
- 2 grands agitateurs rotatifs
- 1 spectrophotomètre enregistreur
- 10 jeux d'électrophorèse
- 2 centrifugeuses de parquet à vitesse moyenne
- 2 centrifugeuses à grande vitesse (comme Beckman L8-70)

(b) Salle de contention biologique (niveau p2) avec:

- 2 hottes de flux laminaires
- 2 grands agitateurs rotatifs
- 2 centrifugeuses vitesse moyenne
- 1 centrifugeuse grande vitesse
- 1 autoclave
- 2 microscopes
- 2 bains-marie
- 2 incubateurs

(c) Une salle de préparation de milieux et de stérilisation avec:

- 1 autoclave
- 1 hotte stérile
- 1 alambic en verre
- 2 balances

- (d) Une chambre froide à 4° avec:
 - 1 petite centrifugeuse
 - 2 bains-marie
 - plusieurs colonnes pour la chromatographie

- (e) Une chambre froide à -20°

- (f) Une chambre noire avec:
 - 1 appareil automatique de développement de films à rayons X
 - 1 agrandisseur
 - 1 appareil d'impression

- (g) Une salle de nettoyage des instruments avec:
 - 2 lave-vaisselle
 - 1 autoclave
 - 2 fours, etc.

Des chambres ou serres dotées d'appareils de maintien et de contrôle du degré d'hygrométrie et de température seront nécessaires pour la culture de plantes et de cellules.

Références pour le carburant liquide à partir de la biomasse

1. A.E. Humphrey (1979) in Hydrolysis of Cellulose. Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis (Eds. R.D. Brown, Jr. and L. Jurasek) p. 25, Amerc. Chem. Society, Washington, D.C.
2. Gorg, C.S., Ladisch, M.R. and Tsao, G.T. (1979) in Hydrolysis of Cellulose: Mechanism and enzymatic and acid catalysis (Eds. R.D. Brown and L. Jurasek), 261.
3. Mandels, M. and Andreotti, R.E. (May, 1978) Process Biochem., pp 6-13.
4. Andreotti, R.E., Medeiros, J.E., Roche, C.R. and Mandels, M. (1981) Proc. Second Int'l. Sympo. on Bioconversion, New Delhi, India (Ed. T.K. Ghose), Vol. 1, 353-372.
5. "Methods in Enzymology" (1979) Recombinant DNA (Ed. R. Wu) Vol. 68.
6. "A Manual for Genetic Engineering: Advanced Bacterial Genetics" (1980) (Eds. R.W. Davis, D. Bostein, J.R. Roth), Cold Spring Harbor Lab.
7. Smith, M. and Gillam, S. (1981) Genetic Engineering (Eds. J.K. Setlow, A. Hollaender) 3, 1.
8. Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, J. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929.
9. Entian, K.-D. and Zimmermann, F.K. (1980) Molec. Gen. Genet. 177, 345.
10. Rogers, P.L., Phil, D., Lee, K.J. and Tribe, D.E. (1980) Process. Biochem. 15, 7.
11. Whittle, D.J., Kilburn, D.G., Warren, R.A.J. and Miller, Jr. R.C. (1982) Gene 17, 139.
12. Bland, R.R., Chen, H.C., Jewell, W.J., Bellamy, W.D. and Zall, R.R. (1982) Biotech. Letters 4, 323.
13. Switzenbaum, M.S. and Jewell, W.J. (1978) Annual Water Pollution Control Federation Conference, Anaheim, Cal. 42 pp.
14. Shimatake, H. and Rosenberg, M. (1981) Nature 292, 128.

15. Gong, C.S., Chen, L.F., Flickinger, M.C. and Tsao, G.T. (1981)
(Ed. A. Fiechter) Adv. Biochem. Engineering 20, 93.
16. Chiang, L.C., Hsiao, H.Y., Ueng, P.P. Chen, L.F. and Tsao G.T.
(1981) Biotech. Bioengineering Symp. 11, 263.
17. Detroy, R.W., Cunningham, R.L., Bothast, R.J., Bagby, M.O., and
Herman, A. (1982) Biotech. Bioengineering 24, 1105.

BIBLIOGRAPHIE

Projet de fixation d'azote

- Brisson, N. and Verma, D.P.S. (in press) "Soybean Leghemoglobin Gene Family: Normal, Pseudo and Truncated Genes". PNAS.
- Hyldig-Nielsen, et al. (1982) "The Primary Structure of Two Leghemoglobin Genes from Soybean." Nucleic Acid Res. 10:688.
- Roberts, G.P. and Brill, W.J. (1981) "Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation." Ann. Rev. Microbiol. 35:207-235.
- Bánfalvi, Z., Sakanyan, V., Koncz, C., Kiss, A., Dusha, I., and Kondorosi, A. (1981) "Location of Nodulation and Nitrogen Fixation Gene on a High Molecular Weight Plasmid of R. meliloti."
- Friedman, A.M., Long, S.R., Brown, S.E., Buikema, W.J., and Ausubel, F.M. (in press) "Construction of a Broad Host Range Cosmid Cloning Vector and Its Use in the Genetic Analysis of Rhizobium Mutants."
- Ruvkun, G.B. and Ausubel, F.M. (Jan. 1981) "A General Method for Site-directed Mutagenesis in Prokaryotes." Nature 289:85-88.
- Beringer, J.E., Beynon, J.L., Buchanan-Wollaston, A.V., Johnston, A.W.B. (Dec. 1978) "Transfer of the Drug-resistance transposon Tn5 to Rhizobium." Nature 276:633-634.
- Zurkowski, W. and Lorkewicz, Z. (1979) "Plasmid-mediated control of nodulation in Rhizobium trifolii," Arch. Microbiol. 123:195-201.
- Nuti, M.P., Lepidi, A.A., Prakash, R.K., Schilperoort, R.A., and Cannon, F.C. (1979) "Evidence for nitrogen fixation (nif) genes on indigenous Rhizobium plasmids," Nature 282:533-535.
- Krol, A.J.M., Hontelez, J.G.J., van den Bos, R.C. and van Kammen, A. (1980) "Expression of large plasmids in the endosymbiotic form of Rhizobium leguminosarum, Nucleic Acids Res. 8:4337-4347.
- Johnston, A.W.B. and Beringer, J.E. (1975) "Identification of the Rhizobium strains in pen root nodules using genetic markers," Microbiol. 87:343-350.

