

**Ecole Nationale
Supérieure de
Bibliothécaires**

**Diplôme Supérieur
de Bibliothécaire**

**Université
Claude Bernard
Lyon I**

**DESS Informatique
Documentaire**

**Projet de recherche
Note de synthèse**



REGENERATION DE PLANTES
A PARTIR D'EXPLANTS CULTIVES IN VITRO
ET TRANSFORMES PAR AGROBACTERIUM.
APPLICATIONS AUX PLANTES LIGNEUSES.

Florence BARRE

Sous la direction de Madame F. DOSBA

Station de Recherches Fruitières
Institut National de la Recherche Agronomique
Bordeaux

1990

1990
ID
1

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée pour la Station de Recherches Fruitières de l'INRA de Bordeaux.

Nous tenons à exprimer notre gratitude à Madame F. DOSBA, Directrice de la Station, qui nous a confié cette recherche bibliographique, et à Monsieur A. PIERRONNET, qui nous a aidé par ses précieux conseils.

REGENERATION DE PLANTES
A PARTIR D'EXPLANTS CULTIVES IN VITRO
ET TRANSFORMES PAR AGROBACTERIUM.
APPLICATIONS AUX PLANTES LIGNEUSES.

SOMMAIRE

RESUME ET MOTS-CLES CONCERNANT LA SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

GLOSSAIRE ET ABBREVIATIONS

INTRODUCTION

P 1

PREMIERE PARTIE: METHODOLOGIE DE RECHERCHE

P 3

I - LE SUJET:

P 3

- 1- Domaine concerné et banques de données correspondantes
- 2- Concepts importants du sujet.

II - EQUATIONS DE RECHERCHE.

P 4

- 1- PASCAL sur TELESYSTEMES
- 2- BIOSIS PREVIEWS sur DATA-STAR
- 3- CAB sur IRS-ESA

III -DISCUSSION DE NOTRE STRATEGIE

P 7

- 1- Choix des termes pour interroger
- 2- Critères de date et de langue
- 3- Antériorité des références
- 4- Redondance
- 5- Choix des textes pour la synthèse bibliographique

DEUXIEME PARTIE: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I- INTRODUCTION: PLACE DE LA REGENERATION DE PLANTES TRANSFORMEES
DANS L'AMELIORATION GENETIQUE DES PLANTES

P 10

- 1- L'amélioration génétique des plantes
- 2- Méthodes de transfert de gènes

II- RESULTATS ACQUIS

P 12

- 1- Utilisation d' *Agrobacterium*
- 2- Matériel végétal utilisé
- 3- Milieux de culture utilisés pour les explants
- 4- Proportions d'explants transformés et de plantes régénérées
- 5- Stabilité de la ploidie chez les plantes régénérées après transformation
- 6- Le phénotype des plantes régénérées
- 7- Interaction entre gènes transmis et génotype de l'hôte
- 8- Maîtrise des gènes transférés

III- LES PERSPECTIVES:

- 1- Gènes "insecticides"
- 2- Gènes de résistance à un virus
- 3- Apparition de nouveaux caractères agronomiquement intéressants

P 19

CONCLUSION

P 21

TROISIEME PARTIE: BIBLIOGRAPHIE

P 22

REGENERATION DE PLANTES
A PARTIR D'EXPLANTS CULTIVES IN VITRO
ET TRANSFORMES PAR AGROBACTERIUM.
APPLICATIONS AUX PLANTES LIGNEUSES.

RESUMES

RESUME FRANÇAIS:

La régénération de plantes transformées est resituée par rapport à l'amélioration génétique des plantes. Puis les principaux acquis en matière de matériels et méthodes utilisables sont présentés, ainsi que les résultats auxquels ils ont conduit, en particulier pour les plantes ligneuses. Les perspectives sont exposées, notamment pour la résistance aux insectes et aux virus.

ENGLISH ABSTRACT:

Transformed plants regeneration is presented, as a part of plant genetic engineering. Main points referring to materials and methods and the results they led to are developed, with emphasis on the case of woody plants. Future prospects, specially in the field of insect and virus resistance are presented.

DESCRIPTEURS PASCAL:

DESCRIPTEURS FRANCAIS

Agrobacterium
Agrobacterium rhizogenes
Agrobacterium tumefaciens
culture tissu
génie génétique
plante ligneuse
régénération
transformation génétique

ENGLISH DESCRIPTORS

Agrobacterium
Agrobacterium rhizogenes
Agrobacterium tumefaciens
tissue culture
genetic engineering
woody plant
regeneration
genetic transformation

GLOSSAIRE

ADN transféré: portion de plasmide transmise par *Agrobacterium* à une plante hôte. Cet ADN transféré s'intègre de façon stable dans le génôme de la plante.

capside: enveloppe protéique protectrice des virus.

co-culture: culture d'explants après infection par *Agrobacterium*, dans des conditions favorables au développement de la bactérie.

crown gall ou galle du collet: excroissance tumorale au niveau du collet, ou sur les racines des plantes infectées par *Agrobacterium tumefaciens*

délétion: destruction d'un gène au niveau du chromosome.

génotype: ensemble des gènes déterminant les caractères d'un individu.

hairy root, ou maladie de la prolifération des racines: prolifération racinaire chez les plantes infectées par *Agrobacterium rhizogenes*

phénotype: expression visible des gènes d'un individu.

phytohormone : régulateur de croissance; par exemple: cytokinine, auxine.

plante herbacée: plante dont les tissus sont exempts de bois.

plante juvénile: plante ne pouvant pas se reproduire, car n'ayant pas atteint le stade de maturité nécessaire.

plante ligneuse: plante dont les tissus contiennent de la lignine, plante formant du bois.

plante mature: plante pouvant se reproduire par voie sexuée.

plasmide: ADN circulaire, porteur de gène pouvant s'exprimer, que possèdent les bactéries.

ploidie: nombre de chromosomes d'un individu.

vecteur binaire: *Agrobacterium* permettant le transfert de gènes grâce à deux plasmides: l'un porte les gènes qui seront transférés, l'autre induit le transfert.

ABREVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique, constituant des chromosomes.

p-Ri: plasmide inducteur de racines (chez *Agrobacterium rhizogenes*).

p-Ti: plasmide inducteur de tumeur (chez *Agrobacterium tumefaciens*).

réf.: référence bibliographique.

T-DNA: ADN transféré.

TMV: virus de la mosaïque de la tomate.

REGENERATION DE PLANTES
A PARTIR D'EXPLANTS CULTIVES IN VITRO
ET TRANSFORMES PAR AGROBACTERIUM.
APPLICATIONS AUX PLANTES LIGNEUSES.

INTRODUCTION:

Les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium rhizogenes* sont deux bactéries du sol infectant de nombreuses dicotylédones ligneuses et herbacées.

Au cours de l'infection elles transmettent aux cellules infectées des plantes-hôtes des fragments de plasmides, c'est à dire de matériel génétique. Les fragments s'intègrent de façon stable dans le génôme de l'hôte, et les gènes qu'ils portent s'expriment. Les plantes ayant intégré ces gènes sont appelées plantes transformées.

L'utilisation d'*Agrobacterium* comme vecteur par les généticiens semble un moyen prometteur d'introduire dans les plantes de nouveaux gènes.

Dans ce domaine, les recherches de F.DOSBA et A.PIERRONNET à l'INRA de BORDEAUX se sont orientées dans plusieurs directions:

1)- La mise au point d'un test de comportement des variétés de *Prunus* sp afin de déterminer si la variété considérée est ou non sensible à l'infection par *Agrobacterium tumefaciens* P. Ce test est désormais au point.

2)- La transformation de porte -greffes *Prunus* sp par *Agrobacterium rhizogenes* P, souche sauvage A4; cette transformation a été réalisée in vitro. L'introduction de matériel génétique provenant de *Agrobacterium rhizogenes* pourrait provoquer, chez les plantes régénérées à partir de racines transformées, l'expression de potentialités agronomiquement intéressantes.

La transformation a été réalisée, et les essais de régénération sont en cours.

3)- L'insertion de gènes codant pour la capsid du virus de la sharka:

Sur le tabac (*Nicotiana tabacum* L.), il est établi que lorsqu'on provoque la fabrication de capsides (enveloppe de nature protéique protégeant le virus) vides de virus par des cellules, ensuite ces cellules ne sont plus sensibles au virus.

F.DOSBA et A.PIERRONNET cherchent donc à savoir si, en faisant fabriquer la capsid du virus de la sharka par les

arbres fruitiers, sensibles à ce virus (*Prunus* sp.), ceux-ci deviennent résistants.

Le gène codant pour les enzymes de synthèse de la capside a été isolé et intégré dans un plasmide d' *Agrobacterium tumefaciens* et d' *Agrobacterium rhizogenes*. Ces souches modifiées ont été inoculées *in vitro* à des *Prunus* sp.

On a obtenu des cals, résultant de la transformation par *Agrobacterium tumefaciens*, et des racines résultant de la transformation par *Agrobacterium rhizogenes*. Cals et racines néoformés sont porteurs des gènes que l'on souhaitait introduire.

Les essais de régénération de plantes à partir de ces cals et racines sont en cours.

La régénération des *Prunus* sp.), qui sont des végétaux ligneux, pose des problèmes spécifiques. Ceux-ci sont dus à plusieurs facteurs:

- Difficultés de régénération des végétaux ligneux.

- Eventuellement, à l'insertion de gènes pouvant modifier l'expression de gènes propres au végétal transformé.

C'est dans ce cadre que nous avons cherché dans les bases de données les publications en matière de régénération après transformation par *Agrobacterium*. Nous nous intéressons en particulier aux végétaux ligneux.

Nous ne faisons pas de recherche manuelle dans les bibliographies signalétiques comme *Plant breeding abstracts*, *Horticultural abstracts*, *Pascal thema*.

Ce serait nécessaire pour une recherche exhaustive mais cela ferait double emploi avec certaines bases que nous avons sélectionnées pour interrogation; cela est réalisable par ailleurs par la personne qui nous a confié cette interrogation de banque de données.

PREMIERE PARTIE: METHODOLOGIE DE RECHERCHE

I -LE SUJET:

1- Domaine et banques de données correspondantes:

Le domaine concerné est celui des biotechnologies; le sujet aurait pu être posé ainsi: " La reconstitution de plantes normales à partir d'explants (fragments de pousses, embryons, cellules) cultivés in vitro. et dans lesquels on a introduit de nouveaux gènes grâce à une bactérie du genre *Agrobacterium*? . Cas particulier des plantes ligneuses".

Ce sujet de biotechnologie englobe des aspects de la physiologie des plantes, et du génie génétique pour *Agrobacterium* et pour les plantes.

Trois banques de données bibliographiques couvrent ces domaines et pourraient répondre à notre question:

NOM	DOMAINES COUVERTS	SERVEURS ¹	VOLUME	DATE DE CREATION ²
PASCAL (CNRS)	Pluridisciplinaire en Sciences et Techniques entre autres Agronomie	<u>Télé systèmes</u> IRS-ESA	6 500 000 réf + 430 000 réf/an	1973
CAB (Commonwealth Agricultural Bureau)	Agronomie	<u>IRS-ESA</u> DIALOG,ERS, DIMDI CAN/OLE	2 000 000 + 150 000 réf/an	1972
BICSI5 PREVIOUS	Sciences biologiques et médicales	<u>DATA STAR</u> <u>IRS-ESA</u> ERS, DIMDI STN	5 700 000 + 450 000 réf/an	1969

2- Les concepts les plus importants dans le sujet sont:

Régénération de plantes
Agrobacterium
culture in vitro
plante ligneuse

1 - Le serveur que nous avons utilisé est souligné.

2 - Les références les plus anciennes peuvent varier d'un serveur à l'autre.

II- EQUATIONS DE RECHERCHE :

1- Interrogation de PASCAL sur TELESYSTEMES:

Question	Nombre de réponses si intérêt	Commentaires
1 regeneration 1M plant??		français/anglais
2 culture? 1M vitro		français/anglais
3 1 et 2 ..VI Q3 1-5	32	La régénération concerne des cultures <u>in vitro</u> .
4 1 sauf 3 ..VI Q4 1-5		On abandonne le critère <u>Culture in vitro</u>
5 plante? AV ligneuse?		On aurait pu demander woody plant
6 1 et 5	0	On abandonne le critère plante ligneuse
7 agrobacterium ..IND agrobacterium		français/anglais On visualise l'index pour voir s'il existe des orthographes voisines Il n'y en a pas.
8 1 et 7	6	
9 3 ou 8	36	
10 3 et 7	2	

* Résultats:

Pertinence sur la question 9:	100%
Bruit	0%
Silence	?
Nombre de références pertinentes par rapport à la question "régénération de plantes par transformation par Agrobacterium"	6
Nombre de références concernant	
Plantes herbacées	6
Plantes ligneuses	0
Nombre de références sélectionnées pour leur intérêt	4

2- Interrogation de BIOSIS PREVIEWS sur DATA STAR:

Question	Réponses quand intérêt	Commentaires
1 plant\$ with regeneration\$	1253	
2 agrobacterium		mot-clé

	or 07200.BC. - - - - -		eubactériales, 1969-1978
	or 04718.BC. - - - - -	5525	rhizobiacées, 1979--
3	25202.BC. - - - - -		monocotylédones
	or 25305.BC. - - - - -		graminées
	or 25345.BC. - - - - -	4723	liliacées.
4	1 and 2	35	
5	4 not 3	35	Elimination de groupes végétaux qui ne nous intéressent pas Résultats indentiques à 4°

* Résultats:

Pertinence sur la question 4: 98%(34/35)
 Bruit (indexation "négative") 2%(1/35)
 Silence ?

Nombre de références pertinentes
 par rapport à la question:
 "régénération de plantes après
 transformation par Agrobacterium 34
 Nombre de références concernant
 Plantes herbacées 29
 Plantes ligneuses 5

Nombre de références sélectionnées
 pour leur intérêt 12

3- Interrogation de CAB sur IRS-ESA:

Question	Nombre de réponses si intérêt	Commentaires
1 plant? (1w) regeneration	1004	
2 tissue? (w) culture?	18699	
3 invitro - - - - -	10	En un seul mot
4 vitro (w) culture?	1688	
5 genetic (w) transformation?		920 ref.
6 bacterial (w) transformation?		8 ref.
7 agrobacterium	2316	
8 5 + 6 + 7	3242	
9 2 + 3 + 4	18703	
10 1 * (2+3+4)*(5+6+7) - - -	10	
11 1 * (5+6+7) - - - - -	26	Le concept de culture de tissus (question 9) introduit un silence important: 16/26
12 1 - 10 - - - - -	16	
13 1 * 7 - - - - -	22	Si on avait utilisé 1*7, au lieu de 1*(5+6+7), on aurait eu un silence de 4/26

* Résultats:

Pertinence sur la question 11:	100%
Bruit	0%
Silence	?
Nombre de références pertinentes par rapport à la question: "régénération de plantes après transformation par Agrobacterium	17
Nombre de références concernant	
Plantes herbacées	23
Plantes ligneuses	3
Nombre de références sélectionnées pour leur intérêt	4

III - DISCUSSION DE NOTRE STRATEGIE:

1- Choix des termes pour l'interrogation:

Nous avons écarté les deux critères suivants:

- culture in vitro, car la visualisation de notices nous montre que la régénération concerne ici des cultures in vitro de plantes.

- plante ligneuse: ce terme trop vague n'est pas employé à propos de la régénération de plantes.

Ceci peut s'expliquer car le terme employé (dans le titre, le résumé, les descripteurs) est le nom (genre, ou genre et espèce) de la plante, plutôt que ce terme générique vague. Si nous nous intéressions à une plante en particulier, nous devrions la désigner ainsi.

Nous avons donc élargi notre recherche, en éliminant ce critère, en fait nous avons posé la question: régénération de plantes après transformation par Agrobacterium. Nous avons été amenée à sélectionner de visu, parmi les références obtenues celles qui nous intéressent.

En utilisant comme concept "régénération de plantes" plutôt que "transformation", nous nous sommes intéressée à la régénération en tant que sujet principal des travaux publiés.

Mais certaines publications ayant pour sujet principal la transformation de plantes par Agrobacterium, la transformation génétique des plantes, la guérison plasmidique des plantes, les cultures de protoplastes, abordent parfois des aspects de la régénération.

* Nous aurions pu interroger également par genetic transformation ou bacterial transformation les bases PASCAL et BIOSIS, comme nous l'avons fait ultérieurement pour CAB.

En ne l'ayant pas fait, nous avons probablement introduit un silence.

Ce silence est de 4/26 dans l'interrogation de CAB, et le bruit apporté par l'emploi de ces termes est de 9/26. En outre ces quatre textes se révèlent d'un intérêt moyen, et ne sont pas retenus pour la synthèse bibliographique.

* Nous avons interrogé en langage libre car les concepts que nous employions n'existent pas dans le vocabulaire contrôlé des trois banques de données, sauf la désignation des bactéries.

En outre dans ce domaine, il n'existe pas de vocabulaire scientifique "unique".

Pour être exhaustif, il aurait fallu interroger avec un grand nombre de synonymes introduisant un bruit important, et faire par la suite un tri de visu. Dans ce cas une recherche manuelle aurait peut-être permis une sélection beaucoup plus fine.

2 - Critères de date et de langue:

Nous n'avons pas imposé de critère de date ni de langue. L'antériorité des bases sur les serveurs choisis est satisfaisante.

Les publications dans notre domaine d'investigation étant difficiles à trouver, nous ne voulons pas restreindre sur le critère de la langue.

3 - Antériorité des références:

Nos interrogations ont été réalisées en février 1990 sur des banques de données mises à jour mensuellement.

Les références les plus récentes que nous ayons obtenues sont de juillet 1989, "elles datent de six mois". Ce délai est compréhensible compte tenu du temps nécessaire au dépouillement et à l'indexation.

Cependant, avec une recherche manuelle, dans les bibliographies analytiques citées en introduction, il eût été plus court.

4 - Redondance:

La redondance d'une base à l'autre est faible: un seul texte est commun à PASCAL et BIOSIS: MA et XIANG (1986), référence numérotée 13.

5 - Choix des textes pour la synthèse bibliographique:

Pour la synthèse bibliographique, nous avons retenu 24 publications.

Leurs références sont présentées dans la troisième partie, par ordre alphabétique, avec cependant une numérotation qui nous permet de les citer par groupes plus aisément dans cette partie méthodologique.

Nous avons fait notre choix en fonction de l'intérêt scientifique des textes, de la façon suivante:

Origine des références	Plantes ligneuses ¹	Plantes herbacées	total
PASCAL	0 réf	4 réf: n° 1, 13, 15, 21	4 réf
BIOSIS	5 réf: n° 5, 6, 14, 17, 20	7 réf: n° 2, 4, 7, 8, 9, 12, 24	12 réf
CAB	3 réf: n° 11, 18, 23	1 réf: n° 10	4 réf
BIBLIOGRAPHIES des textes issus de l'interrogation	1 réf: n° 10	3 réf: n° 3, 16, 22	4 réf
TOTAL	9 réf	15 réf	24 réf

¹ - Pour les plantes ligneuse, tous les textes présentaient de l'intérêt, et ont été retenus.

REGENERATION DE PLANTES
A PARTIR D'EXPLANTS CULTIVES IN VITRO
ET TRANSFORMES PAR AGROBACTERIUM.
APPLICATIONS AUX PLANTES LIGNEUSES.

DEUXIEME PARTIE: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE
I-INTRODUCTION: PLACE DE LA REGENERATION DE PLANTES
TRANSFORMEES DANS L'AMELIORATION GENETIQUE DES PLANTES:

L'amélioration génétique permanente des plantes cultivées est indispensable pour augmenter la résistance de celles-ci aux maladies, aux ravageurs, augmenter leur adaptation aux conditions de milieu, ou leur conférer des caractères techniques et commerciaux souhaitables.

1°- L'amélioration génétique des plantes:

Théoriquement, le Génie génétique peut avoir recours à plusieurs techniques (pour une revue de celles-ci, voir MAC GRANAHAM et al. (1988))

- L'identification et l'utilisation de la variation polygénique ou de gènes majeurs. Ceux-ci sont ensuite transmis par croisement aux plantes que l'on souhaite modifier.

C'est un processus très long; en particulier pour les espèces ligneuses ; en effet celles-ci ont une période juvénile (durant laquelle elles ne peuvent se reproduire) longue de plusieurs années. En outre ces espèces sont souvent hétérozygotes, ce qui complique tout programme de sélection basé sur les croisements (HAISSIG et al., 1987).

- Les techniques de transfert de gène par voie asexuée.

Ceux-ci sont réalisés *in vitro* et ils sont beaucoup plus rapides que la recombinaison sexuée (quelques mois au lieu de quelques années). C'est pourquoi ils présentent un grand intérêt pour les espèces ligneuses.

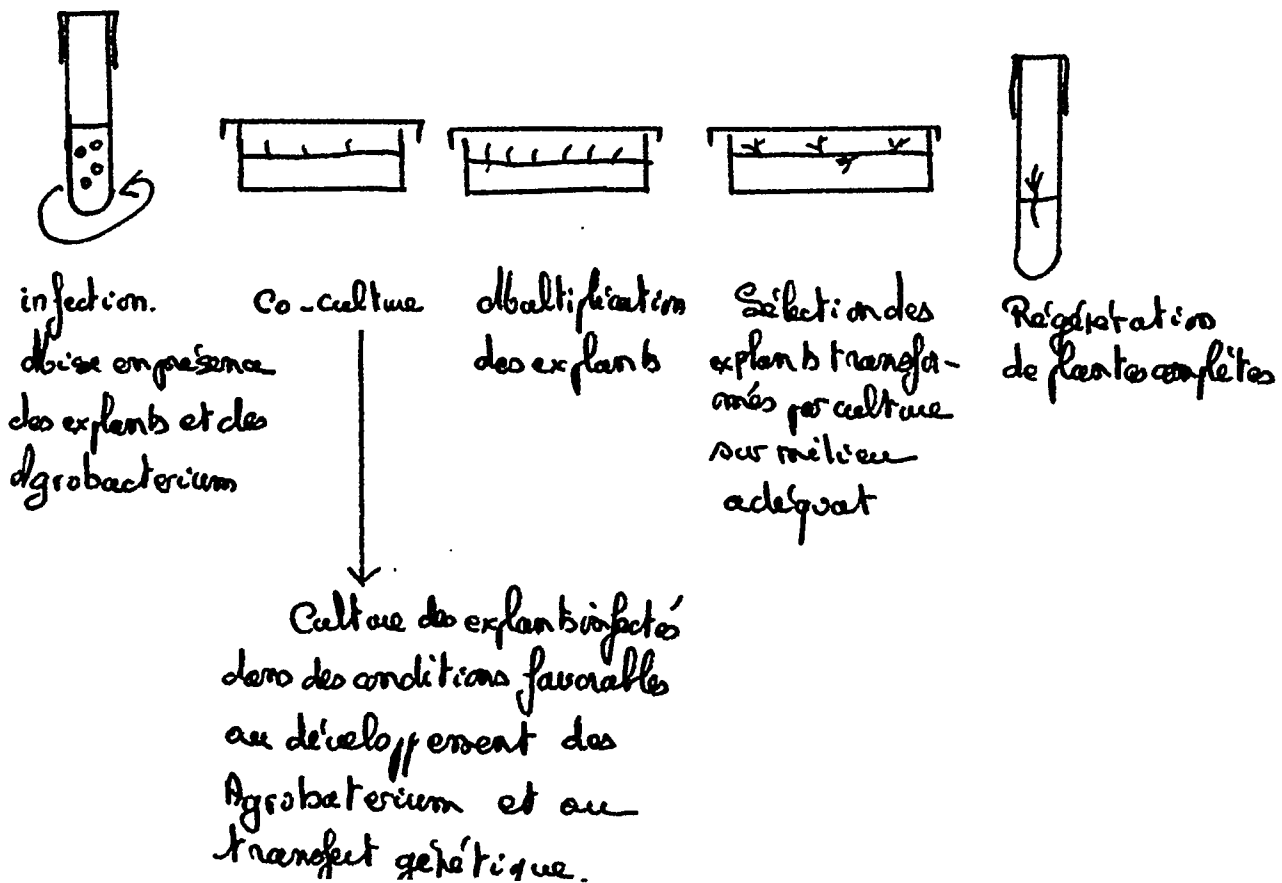
2°- Méthodes de transfert de gène (voir aussi FILLATI et al., (1987))

- Des méthodes comme la microinjection, ou l'absorption directed'ADN par les cellules végétales (électroporation) ont été utilisées avec succès sur plantes herbacées, mais non sur plante ligneuse.

- La méthode de transfert de gène la plus efficace utilise des bactéries du genre *Agrobacterium*, *Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium rhizogenes*, comme vecteurs de gènes.

3- Transfert de gènes grâce à *Agrobacterium* :

In vitro , le processus comporte plusieurs étapes :



Ce procédé fait appel à plusieurs disciplines des biotechnologies, notamment la culture de tissus végétaux, et le génie génétique sur *Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium rhizogenes* .

II- LES RESULTATS ACQUIS:

1°- Utilisation d' Agrobacterium :

Agrobacterium tumefaciens et Agrobacterium rhizogenes sont deux bactéries du sol , qui infectent de nombreuses dicotylédones ligneuses ou herbacées.

Agrobacterium tumefaciens est responsable de renflements cancéreux situés au niveau du collet ou sur les racines des plantes hôtes, et appelés "crown-gall", ou galle du collet.

Agrobacterium rhizogenes provoque au niveau des racines et des points d'infection le "hairy root", ou prolifération des racines.

Agrobacterium tumefaciens et Agrobacterium rhizogenes ont la capacité naturelle de transférer chez leurs hôtes des gènes grâce à un plasmide spécifique.

Les stratégies de transfert de gène utilisant ces deux bactéries reposent sur cette capacité.

Ces plasmides sont désignés par "plasmide inducteur de tumeur" pour Agrobacterium tumefaciens (p-Ti ci-dessous), et "plasmide inducteur de racine" pour Agrobacterium rhizogenes (p-Ri ci-dessous) (SHAH et al., 1987).

Un petite portion de ce plasmide (8 à 23 kilobases sur les 150 à 250 kilobases qui constituent le p-Ti) est transféré dans le génôme des cellules hôtes et s'intègre stablement à celui-ci.

Il provoque alors les troubles spécifiques à chaque bactérie (SHAH et al., 1987).

Cette portion d'ADN (noté ci-dessous T-DNA) est transférée dans le génôme de la plante grâce à un autre segment d'ADN situé sur le p-Ti ou le p-Ri, et appelé région de virulence, ou région vir ((SHAH et al., 1987, SINKAR et al., 1987, PYTHOUD et al., 1987).

Ce T-DNA est transcrit en ARN polyadénylé; il code pour les protéines associées à la formation de galles ou de racines (JAMES ,1987).

Certaines de ces protéines sont des enzymes .
Certaines fabriquent les amino-acides de type opine (agropine, agrocinopine, mannopine). Ceux-ci fournissent l'unique source de carbone et d'azote utilisé exclusivement par l'organisme infectant.
D'autres enzymes sont impliquées dans la biosynthèse de phytohormones, les cytokinines et l'acide indoleacétique (ou auxine). C'est pourquoi la transmission du T-DNA permet aux plantes transformées de croître en l'absence d'hormone d'origine exogène.

La vérification que les plantes sont transformées peut donc se faire par plusieurs moyens:

- dosage des opines dans les tissus végétaux
- culture sur milieu sans hormone (les plantules transformées sont seules à pouvoir croître)
- recherche dans l'ADN des cellules des gènes à transférer, par analyse (Southern blotting, Western blotting, Northern blotting; voir par exemple MAC GRANAHAM et al. (1988); VISSER et al. (1989)).

Les méthodes utilisées se déroulent en plusieurs étapes: isolement de l'ADN des cellules potentiellement transformées, électrophorèse pour le séparer en ses différents éléments, et hybridation avec une sonde radioactive.

Celle-ci est un fragment d'ADN identique à celui que l'on souhaite transférer.

Si l'ADN analysé a intégré le segment recherché, l'hybridation se produit et est détectable par procédé radiographique.

2°- Matériel végétal utilisé:

* Les premiers travaux sur la transformation *in vitro* par *Agrobacterium* ont été réalisés essentiellement sur le tabac (*Nicotiana tabacum* L.).

Des protoplastes de tabac ont été co-cultivés avec *Agrobacterium*, et des plantes entières ont été régénérées (POTRYKUS et al. 1985).

Mais toutes les plantes ne peuvent pas être régénérées à partir de cultures de protoplastes; c'est le cas de nombreuses plantes ligneuse (JAMES, 1987; HAISSIG et al. 1987).

JAMES (1987) attribue certains échecs au fait que, lors des expérimentations "ces cellules cultivées, dans des conditions de croissance rapide, étaient de ce fait incapables de régénérer des plantes".

LIU et al. (1987) ont montré qu'il est possible de transformer des suspensions de cellules de carottes (*Daucus carota* L.) avec *Agrobacterium tumefaciens* et de régénérer des plantes transformées.

MA et XIANG (1986) ont obtenu la régénération spontanée à partir de tissus de type tératome de *Datura innoxia* L. infectés par *Agrobacterium tumefaciens*.

* Des méthodes de transformation et régénération "standard" ont été mises au point sur des plantes herbacées qui se prêtent particulièrement aux cultures *in vitro*, à la transformation par *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium*

rhizogènes et à la régénération, comme les solanées (HORSCH et al., 1985; SHEERMAN et al., 1988).

HORSCH et al. (1985) ont obtenu la régénération de plants de tomate (*Solanum esculentum* L.) de tabac (*Nicotiana tabacum* L.) et de pétunia (*Petunia hybrida* L.).

Pour cela ils ont utilisé de petits disques de feuilles (de 6 mm de diamètre), co-cultivés avec *Agrobacterium tumefaciens*. Dans une première étape, il y a production de pousses puis celles-ci sont prélevées et placées sur un milieu favorisant l'enracinement.

Outre les disques foliaires, (HORSCH et al., 1985; VISSER et al., 1989; HANISCH TEN CATE et al., 1988), d'autres explants complexes peuvent être utilisés. SHEERMAN et al. (1988), HANISCH TEN CATE et al. (1988), HANISCH TEN CATE et al. (1987) utilisent des disques de tubercules de pomme de terre.

BARTON et al. (1983), SPANO et COSTANTINO (1982), VISSER et al. (1989), DE VRIES-UIJTEWAAL et al. (1989).

DAVID et TEMPE (1988) utilisent des plantules de chou-fleur (*Brassica oleracea* L.).

* La régénération se fait à partir de pousses (BARTON et al., 1983; HORSCH et al., 1985; VISSER et al., 1989; SHEERMAN et al., 1988), ou des racines (DE VRIES-UIJTEWAAL et al., 1989; HANISCH TEN CATE et al., 1988; HANISCH TEN CATE et al., 1987) apparues après l'infection.

Pour SPANO et COSTANTINO (1982), et MA et XIANG (1986) la régénération passe par un stade intermédiaire de cal.

Cependant ce stade est un stade d'instabilité génétique conduisant à une grande variation; les effets de celle-ci peuvent se superposer à ceux de la transformation.

* Chez les végétaux ligneux, les explants employés sont :

- des tissus matures : des tiges de saule, *Salix* sp., sont employés par VAHALA et al. (1989).

- ou des tissus juvéniles : PYTHOUD et al. (1987) emploient des pousses juvéniles de peuplier (*Populus* sp.); FILLATI et al. (1987) emploient des morceaux de feuilles sur *Populus*.

MAC GRANAHAM et al. (1988) emploient des embryons somatiques de noyer (*Juglans regia* L.).

La juvénilité (c'est à dire l'incapacité de se reproduire, donc de produire des fruits) n'est pas un obstacle pour l'exploitation d'arbres forestiers (car on exploite leur bois, non leurs fruits).

Mais c'est un handicap pour l'exploitation d'arbres fruitiers.

Dans tous les cas la régénération de pousse est atteinte, à partir des explants cités ci-dessus. Mais l'enracinement de ces pousses dans des proportions non négligeables n'est pas toujours réalisé.

Il a été obtenu dans le cas de feuilles de peuplier (FILLATI et al., 1987), d'embryons somatiques de noyer (VAHALA et al., 1989), et dans le cas du pommier (*Malus sp.*, JAMES et PASSEY, 1988).

La formation de racines est réalisée aussi sur des plantes de la même espèce et de la même variété, ou d'une variété voisine, cultivées *in vitro* dans les mêmes conditions de culture mais non transformées.

3°- Les milieux de culture utilisés pour les explants:

Les milieux de culture utilisés pour la coculture d'*Agrobacterium* et des explants à transformer sont des milieux standard (HORSCH et al., 1985; DE VRIES-UIJTEWAAL et al., 1989; HANISCH TEN CATE et al., 1987) ou des milieux de base contenant les sels de MURASHIGE et SKOOG.

Pour la multiplication et la régénération, ce sont des milieux standards (MAC GRANAHAM et al., 1988 ; HORSCH et al., 1985), ou bien ce sont des milieux de base contenant les sels de MURASHIGE et SKOOG.

Ils sont ainsi modifiés:

- sans hormone, pour sélectionner les explants transformés (PYTHOUD et al., 1987).

- avec antibiotique, pour sélectionner les plantes transformées dans lesquelles on a introduit un gène de résistance à un antibiotique (BARTON et al., 1983)

- avec hormones pour induire la croissance de pousses, quand régénération à partir de racines (SPANO et COSTANTINO, 1982; SHAH et al., 1987) ou à partir de cals (DE VRIES UIJTEWAAL et al., 1989; HORSCH et al., 1985). Généralement on emploie une combinaison d'auxine (0,1 à 1 mg/l) et de cytokinine (1 mg/l).

- sans hormone, pour induire l'enracinement, et éventuellement avec du saccharose (HORSCH et al., 1985; SHEERMAN et BEVAN, 1988).

4- Proportions d'explants transformés et de plantes régénérées:

Les proportions d'explants transformés varient d'une espèce à l'autre et d'une variété à l'autre: SHEERMAN et BEVAN (1988) ont obtenu la transformation de 30% de pousses de *Solanum tuberosum* par *Agrobacterium tumefaciens*, VISSER et al. (1989) ont obtenu la transformation par *Agrobacterium tumefaciens* de 30% de feuilles.

La même observation vaut pour la régénération:

FILLATI et al.(1987) ont obtenu la régénération de plantules de peuplier par 32% des explants transformés par *Agrobacterium tumefaciens* P; MAC GRANAHAM et al.(1988) ont obtenu la régénération sur 8% des explants de noyer transformés.

5- Stabilité de la ploïdie chez les plants régénérés après transformation:

Les observations de HANISCH TEN CATE et al.(1988) , avec *Agrobacterium rhizogenes* sur *Solanum tuberosum* L., et BARTON et al.(1983) sur *Nicotiana tabacum* L., ont montré que l'insertion de gènes provenant d'*Agrobacterium* ne modifie pas la ploïdie (c'est à dire le nombre de chromosomes) des plantes transformées et régénérées.

6- Le phénotype des plantes régénérées:

Des plantes régénérées , possédant plusieurs copies de T-DNA dans leur génôme, ont un "aspect" normal: absence de crown gall et de hairy root (MAC GRANAHAM et al.,1988;FILLATI et al.,1987;BARTON et al.,1983)

Cependant les plantes régénérées ont souvent un phénotype anormal; c'est le cas en particulier des plantes régénérées après transformation par une souche sauvage (dont le pouvoir pathogène n'a pas été amoindri), ou du moins par une souche oncogène. TEPFER (1984)recense un certain nombre de ces aberrations.

Les plantes régénérées après transformation par p-Ti ont souvent des tiges présentant une fasciation et de petites feuilles (JAMES ,1987).

Les plantes régénérées après transformation par p-Ri manifestent souvent une hétérostylie (HANISCH TEN CATE et al.,1988;SPANO et COSTANTINO ,1982; TEPFER ,1984), des feuilles gaufrées, des entre-noeuds plus courts, une perte de la dominance apicale, une augmentation du nombre de racines (SINKAR et al. ,1987;DAVID et TEMPE ,1988).

Des plantes issues d'explants transformés présentent un retour au phénotype normal.

VISSER et al.(1989) ont noté que des plants de pomme de terre régénérés n'expriment pas le gène transmis de résistance à un antibiotique, la kanamycine.

BARTON et al.(1983) ont observé que des plants de tabac régénérés après transformation par *Agrobacterium tumefaciens* ne produisent pas d'opine, bien que possédant plusieurs copies de T-DNA.

D'où l'hypothèse que ces gènes transmis par le T-DNA pourraient être réprimés.

DE VRIES-UIJTEWAAL et al. (1989), ont transmis deux caractères à des plants de tabac grâce à *Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium rhizogenes*; ils ont observé que certaines plantes ne manifestent que l'un des deux caractères.

Les gènes pourraient avoir subi une délétion partielle, par exemple lors de processus de différenciation des tissus végétaux qui les ont intégrés, au moment de la régénération.

Ils pourraient aussi être inactivés par méthylation de l'ADN, ou par un autre processus d'interaction avec le génôme de la plante hôte.

7- Interaction entre gènes transmis et génotype de l'hôte:

VAHALA et al. (1989) ont obtenu la régénération de pousses de saule (*Salix* sp.) transformées par *Agrobacterium tumefaciens*.

Mais la formation de racines était inhibée, alors qu'elle se produit spontanément dans les mêmes conditions de culture, sur des explants non transformés.

JAMES (1987) a essayé sans succès 20 combinaisons de milieux de culture pour régénérer le pommier M9 à partir de racines transformées par *Agrobacterium rhizogenes*.

Il a également observé que la variété de cerisier Colt (*Prunus cerasus* var. Colt) régénère des pousses, à partir de racines non transformées, mais pas à partir de racines transformées par *Agrobacterium rhizogenes*.

Les aberrations phénotypiques observées, et certaines impossibilités de régénération des plantes transformées semblent dues au fait que les régulateurs de croissance induits par le T-DNA interfèrent avec l'expression d'un phénotype normal (SINKAR et al., 1987).

8-Maitrise des gènes transférés:

Les gènes responsables de la synthèse de ces régulateurs de croissance, cytokinine et auxine, sont situés entre les extrémités du T-DNA; ils ne sont pas indispensables dans le processus de transfert du T-DNA (SHAH et al., 1987).

Partant de cette observation, on a mis au point les techniques employant des plasmides modifiés et des vecteurs binaires.

Pour cela, on modifie le p-Ti ou le p-Ri en détruisant par délétion les gènes inducteurs de tumeur.

On obtient des T-DNA porteurs de la région vir et exempts de gènes oncogènes. On intègre dans le génôme de *Agrobacterium* d'autres gènes à transférer. Ceux-ci ont été au préalable multipliés dans *Escherichia coli*, une bactérie permettant "aisément" ce genre de manipulation.

Les gènes d'origine extérieure peuvent s'intégrer dans le T-DNA, et on parle alors de cis-vecteur .

Ou bien ils s'intègrent dans d'autres plasmides ; la transformation s'effectuera alors grâce à deux sortes de plasmides:T-DNA possédant seulement la région vir et T-DNA comportant les gènes à transmettre.On parle alors de vecteur binaire.

Les premiers essais de régénération de plants après transformation visaient à éprouver les possibilités de régénérer des plantes transformées; Les gènes introduits permettaient d'abord de repérer aisément les plantes transformées.

Souvent la séquence d'ADN utilisée permet la synthèse d'une enzyme.Il s'agit d'une phosphotransférase bactérienne : NPTII pour MAC GRANAHAM et al.(1988) , FILLATI et al.(1987) , BARTON et al.(1983) , PYTHOUD et al.(1987) , VAHALA t al. P(1989), VISSER et al.(1989) , SHEERMAN et al.(1988) , DE VRIES-UIJTEWAAL et al.(1989) ; et HPT pour VISSER et al.(1989) .

Cette enzyme confère aux individus capables de la fabriquer la résistance à un antibiotique: la kanamycine pour NPTII et la kanamycine ou l'hygromycine pour HPT.

Les explants transformés sont alors identifiables car ils peuvent croître en présence de l'antibiotique.

JAMES et PASSEY(1988) ont obtenu la régénération de pommiers après transformation par *Agrobacterium tumefaciens*.

Un application des vecteurs binaires , très intéressante commercialement a été réalisée avec succès par FILLATI et al.(1987): ils ont introduit dans le cultivar de peuplier hybride *Populus alba X P. grandidentata*, grâce à une souche oncogène et modifiée d' *Agrobacterium tumefaciens* , le gène de la résistance à l'herbicide GLYPHOSATE.

Puis ils ont obtenu la régénération de plantes.

Ils ont employé une souche oncogène d' *Agrobacterium tumefaciens* , C 58, dans laquelle ils avaient introduit le gène de résistance.

Ils ont observé que le caractère oncogène de la souche d' *Agrobacterium tumefaciens* employée, stimule la régénération de pousses transformées, alors que chez les solanées elle l'inhibe.

III- LES PERSPECTIVES :

L'emploi des vecteurs binaires ouvre de nouvelles perspectives pour l'introduction de gènes chez les plantes, en particulier des gènes favorisant la résistance à un insecte ou un virus.

1- Gènes "insecticides":

Bacillus thuringiensis est une bactérie produisant une protéine cristalline toxique pour plusieurs espèces d'insectes parmi les lépidoptères, coléoptères, diptères.

Ce gène a été transféré sur le tabac; chez cette plante il augmente la résistance à ces insectes.

L'introduction de ce gène chez les espèces ligneuses présente un grand intérêt dans la lutte contre les insectes (DEAN, 1984).

2- Gènes de résistance à un virus:

Le phénomène de la protection croisée a été observé en 1929 par MAC KINNEY (résultats exposés entre autres par JAMES, 1987) : des plants de tabac infectés par une souche d'un virus deviennent résistants à une souche apparentée.

POWELL-ABEL et al. (1986) ont introduit le gène de la capsid (enveloppe protéique protectrice) d'une souche de virus de la mosaïque de la tomate (TMV) dans des cellules de tomate et de tabac.

La transformation s'est faite grâce à *Agrobacterium*, et des plantes ont été régénérées. Ces plantes étaient moins sensibles à l'infection par le TMV.

La possibilité de transférer aux plantes des gènes viraux afin de les rendre moins sensibles à ces virus ouvre de nouvelles voies à la protection des végétaux.

3- Apparition de nouveaux caractères agronomiquement intéressants:

La régénération de plants transformés par p-Ri ouvre également des perspectives en matière d'adaptation aux conditions de milieu.

En effet, le phénotype des plantes transformées par p-Ri présente certains intérêts agronomiques : car celles-ci ont des racines très ramifiées, dont la croissance est plagiotope, et la vitesse de croissance augmentée.

Ces caractères confèrent aux plantes transformées un meilleur ancrage et une meilleure résistance à la sécheresse. Selon JAMES (1987), il serait intéressant de les introduire chez certains porte-greffe.

CONCLUSION:

Le développement de la régénération après transformation s'est fait grâce à :

- La maîtrise des techniques de culture in vitro et de régénération de plante.

- La délétion des gènes inducteurs de tumeur (codant pour les enzymes de synthèse de phytohormones, cytokinine et auxine).

- Leur remplacement par des gènes marqueurs génétiques (résistance à un antibiotique) ou de nouveaux gènes à introduire (résistance au glyphosate, fabrication de capsid virale).

Le succès de la régénération après transformation repose sur les connaissances dans plusieurs domaines :

- Physiologie de la régénération des plantes cultivées in vitro et facteurs contrôlant celle-ci.

- Capacité à contrôler l'expression des gènes introduits dans les plantes.

- Conséquences du remplacement de gènes chromosomiques des plantes.

- Mécanismes de l'inactivation de l'expression de certains gènes.

- Identification de gènes agronomiquement utiles.

REGENERATION DE PLANTES
A PARTIR D'EXPLANTS CULTIVES IN VITRO
ET TRANSFORMES PAR AGROBACTERIUM
APPLICATIONS AUX PLANTES LIGNEUSES.

TROISIEME PARTIE : BIBLIOGRAPHIE

- 1 -BARTON, K., BINNS, A., MATZKE, A. et al. Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA and transmission of T-DNA to R1 progeny. Cell (Cambridge), 1983, vol.32, n°4, p 1033-1043.
- 2 -DAVID, C. et TEMPE, J. Genetic transformation of cauliflower *Brassica oleracea* var. Botrytis by *Agrobacterium rhizogenes*. Plants cell reports, 1988, vol.7, n° 2, p 88-91.
- 3 -DEAN, D. Biochemical genetics of the bacterial insect-control agent *Bacillus thuringiensis*: basic principles and prospects for genetic engineering. In Biotechnology and genetic engineering reviews. Ed. G.E. RUSSELL. Newcastle upon Tyne: Intercept, 1984, vol 2, p 341-363.
- 4 -DE VRIES-UIJTEWAAL, E., GILISSEN, L., FLIPSE, E. et al. Fate of introduced genetic markers in transformed root clones and regenerated plants of monohaploid and diploid potato genotypes. Theoretical and applied genetics, 1989, vol. 78, n° 2, p 185-193.
- 5 -FILLATI, J., SELLMER, J., MAC COW, B. et al. *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. Molecular and general genetics, 1987, vol.206, n° 1, p 192-199.
- 6 -HAISSIG, B., NELSON, N. and KIDD, G. Trends in the use of tissue culture in forest improvement. Bio/technology (New York), 1987, vol 5, n° 12, p 1323-1327.
- 7 -HANISCH TEN CATE, C., RAMULU, K., DIJKHUIS, P. et al. Genetic stability of cultured hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* on tuber discs of potato cultivar bintje. Plant science (Limerick), 1987, vol.49, n° 3, p 217-222.
- 8 -HANISCH TEN CATE, C., ENIK, E., ROEST, S. et al. Regeneration and characterisation of plants from potato root lines transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Theoretical and applied genetics, 1988, vol.75, n° 3, p 452-459.
- 9 -HORSCH, R., FRY, J., HOFFMAN, N. et al. A simple and general method for transferring genes into plants. Science (Washington D.C.), 1985, vol 227, n° 4691, p 1229-1231.

10-JAMES , D. Cell and tissue culture technology for the genetic manipulation of temperate fruit trees. Biotechnology and genetic engineering reviews, 1987, vol 5, n° 1, p 33-79.

11-JAMES , D. et PASSEY ,A. Genetic manipulation in woody plants. In : Hanover J.W. ED. D.E. KEATHLEY . New York: Plenum press, 1988. p 472.

12-LIU, Z., FAN, M. et CUI, C. In vitro transformation of suspension cultured cells from *Daucus carota* by *Agrobacterium tumefaciens* strain C 58. Scientia sinica. Series B. Chemical, biological, agricultural, medical and earth sciences. 1987, vol. 30, n° 11, p 1144-1151.

13-MA, D. et XIANG, W. (In vitro culture of grapevine and *Datura innoxia* crown galls incited by *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3 strains and regeneration of plants from tumor tissues) . Acta genetica sinica , 1986, vol. 13, n° 6, p 417-422.

14-MAC GRANAHAM, G., LESLIE, C., URATSU, S. et al. *Agrobacterium* mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. Bio/technology (New-York), 1988, vol. 6, n° 7, p 800-804.

15-POTRYKUS, I., SAUL, M., PETRUZKA, J. et al. Molecular and gene ral genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfert. Molecular and general genetics , 1985, vol 199, n° 2, p 183-188.

16-POWELL-ABEL, P., NELSON, R., DE, B. et al. Delay of disease developpement in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science, 1986, vol. 232, n° 1, p 738-743.

17-PYTHOUD, F., SINKAR, V., NESTER, F. et al. Increased virulence of *Agrobacterium rhizogenes*: conferred by the vir region of pTi Bo 542 : application to the genetic engineering of poplar. Bio/technology (New-York), 1987, vol. 5, n° 12, p 1323-1327.

18-SHAH, D., TUMER, M., FISCHHOFF, D. et al. The introduction and expression of foreign genes in plants. Biotechnology and genetic engineering reviews, 1987, vol. 5, n° 1, p 81-106.

19-SHEERMAN, S. and BEVAN, M. A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors. Plant cell reports, 1988, vol. 7, n° 1, p 13-16.

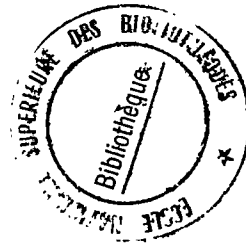
20-SINKAR, V., WHITE, F. and GORDON, M. Molecular biology of Ri plasmid. A review. Journal of bioscience (Bangalore), 1987, vol. 11, n° 1-4, p 47-58.

21-SPANO, L. and COSTANTINO, P. Regeneration of plants from callus cultures of roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* on tobacco. Zeitschrift für pflanzen physiologie, 1982, vol. 106, n° 1, p 87-92.

22-TEPFER, D. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. Cell, 1984, vol. 37, n° 1, p 959-967.

23-VAHALA, T., STABEL, P. and ERIKSON, T. Genetic transformation of willow (*Salix* sp) by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant cell reports, 1989, vol. 8, n° 1, p 55-58.

24-VISSER, R., JACOBSEN, E., HESSELING-MEINDERS, A. et al. Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. Plant molecular biology, 1989, vol. 12, n° 3, p 329-338.



BIBLIOTHEQUE DE L'ENSSIB



8016712