

Les raffinements sexuels d'une bactérie du sol... au service du génie génétique

Yves Chupeau

Caractérisées à l'origine comme les agents responsables de la formation de « tumeurs » végétales, des bactéries du genre *Agrobacterium* ont adapté un système d'excrétion de type IV afin d'adresser une portion délimitée d'un plasmide particulier vers les noyaux végétaux. En un siècle, la conjonction d'un ensemble de recherches en pathologie et en biologie végétales, puis en microbiologie, ont progressivement contribué à la compréhension du processus de transfert de gènes, qui se traduit par un « détournement » métabolique des cellules végétales au profit des bactéries. Depuis que ces processus ont été élucidés, ils ont été mis à profit par les biologistes. Des améliorations successives fournissent aujourd'hui l'ensemble de techniques de transfert de gènes le plus utilisé chez les plantes. Cependant, il reste à comprendre le détail des mécanismes d'intégration dans les génomes « receveur ».

La transgénèse végétale s'est développée au début des années 1980, à peu près dans le même temps que se mettaient en place les techniques efficaces de transferts de gène pour les cellules animales. Avant la fin des années 1990, des raffinements techniques imprimaient des rythmes fulgurants aux applications des techniques de génie génétique chez les plantes (*m/s* 1988, n° 7, p.463 et n° 9, p. 597). Ainsi, la première autorisation de mise sur le marché aux États-

Unis était délivrée dès 1994, pour une tomate à mûrissement ralenti. Rapidement, d'autres plantes de grande culture (maïs, soja...) ont été autorisées en Amérique, et connaissent un réel succès puisqu'elles sont cultivées sur des dizaines de millions d'hectares.

Cependant, il est encore un peu tôt pour décider de leur intérêt agronomique durable, tandis qu'un large débat sur les conditions d'utilisation des plantes transgéniques se développe.

ADRESSE

Y. Chupeau : Laboratoire de biologie cellulaire, Inra U501, Centre Inra de Versailles-Grignon, 78026 Versailles Cedex, France.

Le transfert de gènes chez les plantes

Nous nous limiterons dans ces lignes à l'intérêt scientifique du génie génétique qui constitue avant tout un remarquable outil. Associé aux développements récents de la génomique [1] (séquençage du génome complet de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, analyse globale du transcriptome, du protéome...), le transfert de gènes procure un outil synthétique qui permet de vérifier non seulement la fonctionnalité de la séquence codante mais également d'étudier la régulation de l'activité du gène. Il permet de localiser le produit du gène, dans certaines cellules, et jusque dans les compartiments cellulaires, et encore de caractériser les éventuels partenaires de la protéine. Aujourd'hui, les démarches de génomique fonctionnelle renouvellent complètement les approches de la physiologie et de l'étude du développement des plantes.

Les procédés de transfert « direct » de gènes (Tableau I) mis en œuvre chez les végétaux [2] sont semblables à ceux qui sont utilisés pour les cellules animales.

Nous analyserons donc plus spécialement le système de transfert le plus utilisé, qui repose sur les propriétés naturelles et originales des bactéries du genre *Agrobacterium*, propriétés qui semblent également fonctionnelles pour les cellules animales en culture *in vitro* [11].

Pour les plantes, le développement du génie génétique résulte, pour une très large part, d'une remarquable maîtrise des procédés de clonage, en raison de la totipotence d'un grand nombre de types cellulaires végétaux.

Quelques spécificités du développement végétal

En laissant de côté les aspects évidents qui caractérisent le développement et le fonctionnement d'une plante (nature sessile, photosynthèse, organisation tissulaire), il est utile pour le lecteur d'avoir à l'esprit trois différences qui démarquent les animaux et les végétaux :

– des tissus « embryonnaires » fonctionnent pendant toute la vie de la plante ;

Tableau I. Procédés de transfert de gènes utilisés pour les végétaux.

Date	Procédé	Référence
1983	Utilisation des propriétés des agrobactéries	[3]
1984	Perméation de protoplastes par le polyéthylène glycol	[4]
1984	Utilisation de liposomes sur protoplastes	[5]
1985	Micro-injection	[6]
1986	Électroporation de protoplastes	[7]
1987	Macro-injection	[8]
1988	Biolistique	[9]
1992	Électroporation de cellules et de tissus	[10]

– il n'existe pas chez les plantes de circulation générale d'un milieu intérieur ;

– la durée de vie des cellules différenciées chez les végétaux est courte. Des tissus « embryonnaires » perdurent et fonctionnent pendant toute la durée de vie de la plante : les méristèmes, qui assurent croissance, développement et architecture, jusqu'à la formation des gamètes. En effet, la mise en place, dans les fleurs, des organes sexuels (feuilles modifiées), et la production des gamètes, sont assurés également par les cellules des méristèmes de tige. L'étude du fonctionnement du méristème constitue un domaine crucial de la biologie végétale, et de nombreuses équipes s'y consacrent. Notre laboratoire, voué depuis l'origine à l'étude des méristèmes [12] consacre aujourd'hui des moyens importants à la définition des outils moléculaires adaptés à l'étude du fonctionnement du méristème [13].

Il n'existe pas chez les plantes de circulation générale d'un milieu intérieur. Une différenciation pariétale complexe, la paroi cellulaire (dont le composant essentiel est constitué de fibre de cellulose), limite les agressions, mais aussi les échanges cellulaires. Attention cependant, les cellules végétales dans un tissu jeune, sain et fonctionnel ne sont pas du tout isolées les unes des autres par le « carcan » de la paroi. Les cytoplasmes et même les réticulums de cellules adjacentes sont en continuité au travers de perforations de la paroi. On s'intéresse aujourd'hui à l'organisation des protéines du plasmalemma et du réticulum dans ces perforations. Cette organisation, qui contrôle les mouvements de macromolécules (donc de divers signaux) doit jouer un rôle crucial dans les communications cellulaires. Cepen-

dant, au cours de la différenciation, certains tissus sont progressivement isolés des autres par des parois très épaisses sans aucune perforation [14].

Enfin, la durée de vie des cellules différenciées chez les végétaux est courte, contrairement à l'idée que l'on peut en avoir subjectivement. Certes, on conçoit que les espèces herbacées des zones à climat tempéré assurent un cycle rapide, du printemps à l'été. En dehors des méristèmes justement, une cellule de feuille de blé, photosynthétique (donc totalement différenciée) ne fonctionne que quelques semaines tout au plus. Chez les arbres, dont la durée de vie est évidemment plus longue, outre les territoires méristématiques, seules les cellules de certains tissus conducteurs peuvent fonctionner deux ou trois saisons. Cependant, en culture *in vitro*, les cellules végétales ont effectivement la capacité de se développer indéfiniment. Les mécanismes de différenciation et de sénescence cellulaires ne sont donc probablement pas mis en place de la même façon que chez les animaux.

Le clonage des plantes

Ces quelques spécificités du développement végétal, permettent de comprendre les difficultés initiales pour établir les techniques de culture *in vitro*, surtout dans les premières tentatives qui se proposaient de vérifier la théorie cellulaire selon laquelle, hors de l'organisme mortel, les cellules étaient dotées de la capacité de vie éternelle... La mise en culture d'explants importants, qui comportaient très fréquemment des méristèmes, sur des milieux simples mais sucrés, permettait le plus souvent de faire fonctionner ces méristèmes et

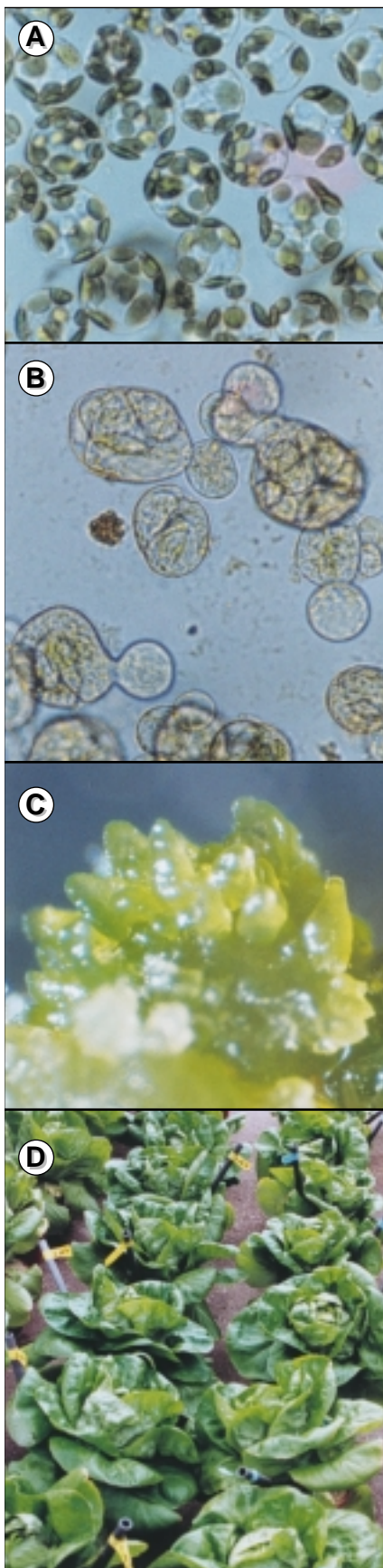


Figure 1. **Le clonage de plantes de laitue.** **A.** Protoplastes de feuilles de laitue. Les chloroplastes se distinguent nettement; les cellules sont sphériques (diamètre moyen 60 μm) en raison de l'absence de paroi qui a été dégradée par des enzymes cellulolytiques. **B.** Après une semaine de culture en milieu liquide, la majorité des cellules reconstituent une paroi et se divisent pour former des colonies cellulaires. **C.** Très jeune bourgeon (2 mm de large) qui résulte du fonctionnement d'un méristème néoformé après repiquage d'une colonie cellulaire sur un milieu approprié. **D.** Après enracinement *in vitro* des bourgeons, les plantules transplantées en serre, poursuivent leur développement (photothèque INRA).

donc de régénérer des plantules mortelles. Rien de mieux que le clonage, par bouturage, connu depuis les débuts de l'agriculture, tandis que la mise en culture de cellules indépendantes se heurtait à l'inadéquation des milieux utilisés : pas de milieu intérieur donc pas de serum ! Pour élaborer des milieux de culture adaptés, il faudra attendre la mise en évidence des substances de croissance végétales, qui sont des molécules assez simples : les auxines dans les années 1940 (dont le type est l'acide indolyl acétique), mais surtout des cytokinines (adénines substituées en 6), dans les années 1950. En culture *in vitro*, l'utilisation combinée de ces deux substances de croissance a enfin permis de provoquer des proliférations à partir d'un grand nombre de tissus, prélevés sur de nombreuses espèces différentes. Surtout, on a pu ainsi progressivement raffiner la composition globale des milieux de culture en adaptant les niveaux des autres constituants (sels, oses, vitamines...). Enfin, la capacité de régénération, sporadiquement observée sur certaines espèces en culture *in vitro*, fut maîtrisée par la découverte essentielle [15] que c'est justement (et simplement) l'équilibre des concentrations de ces deux substances de croissance qui permet d'orienter le type de développement en culture *in vitro*. Il est possible d'obtenir soit la prolifération inorganisée de cellules de type parenchyme, soit la formation de méristèmes radiculaires qui

fonctionnent pour mettre en place des racines, soit la formation de méristèmes apicaux et la production de tigelles.

Aussi et surtout, il est possible de passer d'un type de développement à l'autre en repiquant les tissus de l'un à l'autre des équilibres de substances de croissance. On peut ainsi obtenir la formation de racines à la base de méristèmes apicaux néoformés, reconstituant des plantules complètes capables de poursuivre leur développement en serre, et donc régénérer des plantes qui se révèlent normales et fertiles (en dépit de très nombreux travaux, les modes d'action de ces substances de croissance végétales ne sont pas encore bien compris).

Pour certaines espèces végétales, le processus de régénération est encore plus extraordinaire : les cellules en culture *in vitro* enclenchent un programme d'embryogenèse, dénommé « embryogenèse somatique », dont le déroulement est en tous points comparable à celui des embryons zygotiques.

A la fin des années 1960, dans les laboratoires spécialisés, l'idée de la totipotence des cellules végétales acquiert davantage de consistance, et les vérifications pratiques s'enchaînent. Ainsi, il devient possible d'obtenir des plantes normales et fertiles à partir de cellules indépendantes les unes de autres. La différenciation de la paroi cellulaire constitue cependant un obstacle expérimental. La recherche des conditions de préparation de protoplastes viables (cellules dont la paroi est hydrolysée) aboutit dès le début des années 1970 : il est alors possible de disposer de grandes quantités de cellules indépendantes, isolées directement de la plante et de l'organe choisis, donc avec le génotype et l'état physiologique souhaités (figure 1). Les protoplastes, même s'ils sont plus fragiles, fournissent l'équivalent expérimental des préparations de cellules animales et donc la possibilité de recourir aux différentes techniques de « génétique cellulaire » : sélection biochimique [16], hybridation somatique [17], transfert de gènes [4]. Ces cellules ont l'intérêt supplémentaire de pouvoir régénérer des individus, et ce, avec une efficacité très grande (presque 100 % pour certaines espèces comme le tabac !).

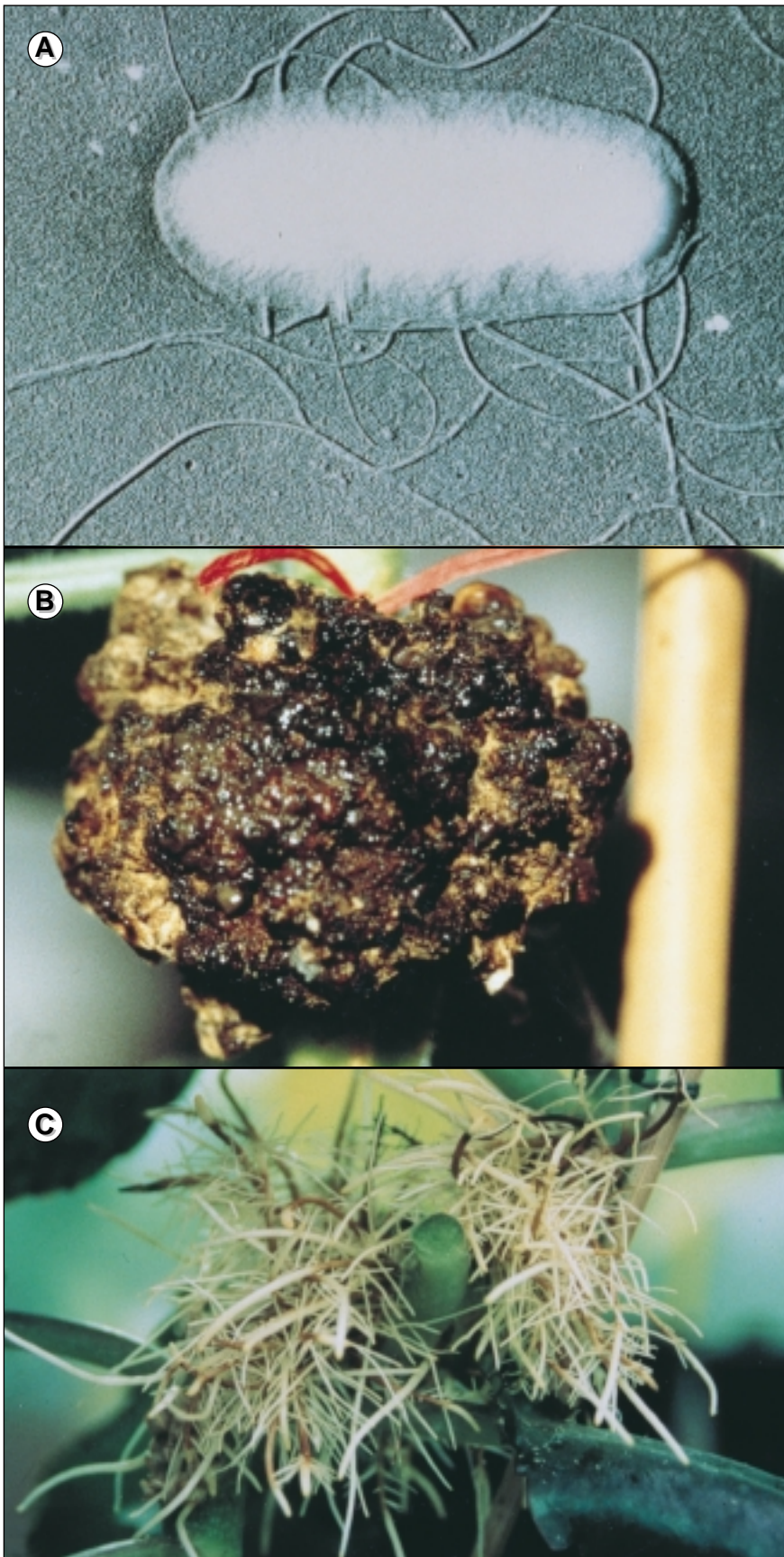


Figure 2. **Agrobacterium et les syndromes « tumoraux ».** **A.** *Agrobacterium tumefaciens* (2 μm de long) en microscopie électronique à balayage (photothèque Institut Pasteur). **B.** Prolifération « tumorale » (5 cm) provoquée par l'inoculation expérimentale d'une agrobactérie, « souche à octopine » sur une tige de tabac (photothèque INRA). **C.** Développement de nombreuses racines sur une tige de Kalanchoé au point d'inoculation d'une souche d'*Agrobacterium rhizogenes* (photothèque INRA).

Il convient de mentionner, au passage, que les cultures indéfinies *in vitro* (depuis plusieurs dizaines d'années), et les très nombreuses plantes clonées, dont un grand nombre seront utilisées en pratique, vérifient que le vieillissement cellulaire chez les végétaux ne repose pas sur les mêmes mécanismes que chez les cellules animales [18].

Les agrobactéries : de la pathologie végétale... au transfert de gènes

Découvertes à la fin du XIX^e siècle, les bactéries du sol du genre *Agrobacterium* seront officiellement caractérisées en 1907 [19]. En effet, elles sont systématiquement associées aux excroissances, parfois volumineuses (figure 2), observées sur les végétaux (*A. tumefaciens*) ou à des chevelus racinaires (*A. rhizogenes*). Ces bactéries provoquent une maladie, la « galle du collet » (*crown gall*), qui entraîne des dégâts essentiellement sur des cultures pérennes (vignes, vergers...) d'où l'intérêt des pathologistes à l'origine pour ces bactéries à Gram négatif. La « célébrité » des agrobactéries se forgera dans les années 1940, après la mise en évidence de la capacité des tissus de ces « tumeurs » de se développer *in vitro* sans apport de substances de croissance [20]. Progressivement, il a été établi que la prolifération des cellules de ces excroissances résultait de la production d'auxine et de cytokinine en quantité plus importante que dans les cellules de tissus normaux. Ces propriétés se manifestaient durablement, en culture *in vitro*, même en l'absence de bactéries. Ce qui a

conduit à formuler l'hypothèse selon laquelle les bactéries mettaient en œuvre « un principe inducteur de tumeur » [21]. Cette hypothèse, un peu floue, a été renforcée par la découverte de nouvelles substances, les opines, produites par les cellules des « tumeurs » [22]. Ces opines, inconnues jusqu'alors dans le monde végétal, sont des guanidines monosubstituées qui résultent de la condensation entre un acide aminé basique et un acide organique, ou un ose. Il existe une grande variété d'opines. La démonstration que les souches de bactéries qui induisaient des « tumeurs » à octopine (condensation entre arginine et acide pyruvique) étaient spécifiquement capables de dégrader cette opine, a permis alors aux collaborateurs de Georges Morel (Inra, Versailles, France) de formuler l'hypothèse, hardie pour l'époque, d'un transfert d'information génétique de la bactérie aux cellules végétales [23].

A cette époque, en dépit des progrès de la biologie moléculaire chez les plantes, les premières vérifications de la présence d'ADN bactérien dans les cellules des tumeurs se sont révélées difficiles [24]. Elles ont d'ailleurs été longtemps controversées... Dans les années 1970, la découverte « officielle » des plasmides [25] chez les bactéries réorientait les recherches sur les agrobactéries, et conduisait à la caractérisation de plasmides spéciaux : les plasmides Ti (*tumor inducing*) dont une portion, la région T, est transférée sous forme d'ADN simple brin dans les cellules végétales viables, à proximité immédiate de blessures [26].

Les relations agrobactéries-plantes

Certains aspects de ces relations ne sont toujours pas éclaircis, mais on dispose aujourd'hui de suffisamment d'éléments [27-29] pour dresser le tableau suivant.

Les agrobactéries se trouvent dans les sols du monde entier. Mobiles, dans la solution du sol, elles sont attirées par les substances émises par les plantes blessées, sucres, acides organiques et surtout composés phénoliques (acétosyringone). Selon les souches bactériennes, et de façon spécifique, ces substances sont égale-

ment activatrices de gènes de virulence. Les produits de ces gènes, protéines de différents complexes fonctionnels, permettent l'arrimage des bactéries sur la paroi des cellules végétales blessées, puis l'excision, la protection, l'excrétion et enfin le ciblage vers les noyaux végétaux de l'ADN-T, une portion définie du plasmide Ti.

Cet ADN-T comporte des gènes de synthèse d'auxine et de cytokinine, ainsi que d'opines, assortis de séquences de contrôle qui permettent effectivement l'expression de ces gènes dans un contexte végétal. Au passage, le promoteur d'un gène bactérien de l'ADN-T sera de fait le premier promoteur caractérisé permettant la transcription dans les cellules végétales [30].

La production de substances de croissance végétale dans les cellules cibles entraîne la réorientation de l'activité de ces cellules vers une synthèse protéique accrue, orientée vers l'activation des processus de division cellulaire. Pour les plantes dicotylédones, cibles naturelles des agrobactéries, ces processus viennent, en fait, renforcer les réactions de cicatrisation des cellules viables à proximité des blessures dont les divisions conduisent, normalement, à former un cal cicatriciel protecteur.

Ainsi, les agrobactéries sujettes à la disette dans les sols, naturellement pauvres, ont mis en place par co-évolution un ensemble de mécanismes d'asservissement de la machinerie cellulaire végétale. Cela leur permet surtout de détourner à leur profit les réserves en molécules organiques d'un végétal, au site de blessure dont le métabolisme est exacerbé. Ce détournement métabolique est entièrement voué à la production de l'opine spécifique de chaque souche. Cette opine constitue donc, d'une part, une source importante de carbone et d'azote pour la bactérie inductrice et, d'autre part, un inducteur spécifique de transferts conjugués [31].

Dans ce schéma général, il faut noter au passage que l'expression transitoire des gènes de l'ADN-T suffit pour rendre compte de l'intérêt du processus pour les bactéries. L'intégration dans les génomes des cellules « receveuses », qui ne semble pas contrôlée par la bactérie (*voir plus*

loin), conduit à la formation de « tumeur » en raison de la capacité de production de substances de croissance exprimée de façon stable. De fait, *in situ*, ces tumeurs sont généralement compactes et perdent souvent la capacité de produire des opines. Elles sont constituées de mosaïques complexes de différents types cellulaires, résultant de différents événements d'insertion de portions variables d'ADN-T. Elles sont d'ailleurs assez rapidement indemnes de bactéries, ce qui permet de les cultiver *in vitro*.

En résumé, les agrobactéries se sont dotées de la capacité de détourner de façon transitoire le métabolisme de certaines cellules végétales afin de festoyer et de désinhiber leur sexualité...

Mécanismes du transfert de l'ADN-T

Le génome d'*Agrobacterium tumefaciens* est tripartite. Il se compose d'un chromosome circulaire, d'un chromosome linéaire et de plasmides. Le plasmide Ti, de grande taille – généralement de 180 à 250 kb –, est limité à la famille des *Rhizobiaceae* (qui comporte deux genres principaux : *Rhizobium* et *Agrobacterium*) [27].

Les mécanismes bactériens du transfert de l'ADN-T sont assez bien connus aujourd'hui (*figure 3*) par l'étude de mutations affectant les fonctions dites de virulence (d'où les appellations un peu ésotériques des différentes composantes : VirA, B, C, D...).

Les fonctions de virulence ne sont pas toutes portées par le plasmide Ti, les produits d'un petit nombre de gènes chromosomiques, qui codent pour des enzymes de synthèse de polysaccharides, sont responsables de l'arrimage des bactéries aux parois végétales, sur des sites particuliers (saturables et sensibles aux protéases).

Pour les gènes de virulence portés par le plasmide Ti, l'induction des opérons de virulence est un système à deux composants : la protéine périplasmique VirA s'autophosphoryle en présence des composés phénoliques relargués par la blessure végétale, puis phosphoryle la protéine VirG qui, à son tour, active la transcription des autres gènes de virulence.

Selon un dispositif assez similaire au fonctionnement des origines de transfert de certains plasmides conjugatifs, les nucléases spécifiques, VirD1 et VirD2, excisent l'ADN-T aux sites spécifiques des séquences-bordures de 24 bases répétées de l'ADN-T. La portion de plasmide destinée à être adressée aux noyaux végétaux est excisée sous forme simple brin, puis re-synthétisée entre les sites de coupure, ce qui régénère un plasmide complet.

Outre son activité de nucléase spécifique, la protéine VirD2 se fixe à l'extrémité 5' de l'ADN-T simple brin et joue un rôle fondamental dans le transfert puisque, outre la protection de l'extrémité 5' contre les exonucléases, la protéine VirD2 comporte deux séquences de ciblage des noyaux (NLS). La protection et l'efficacité du ciblage sont complétées par la fixation de quelques six cents monomères de la protéine VirE2 tout le long de l'ADN-T. Cette protéine contribue à maintenir le complexe nucléoprotéique dans la conformation la plus allongée, la plus fine et étroite possible (2 nm). Elle comporte également deux domaines de ciblage des noyaux. Ce ciblage semble très efficace vers les noyaux des cellules «jeunes», ce qui implique des interactions avec des protéines végétales spécifiques. Il faut noter que le ciblage de la protéine VirD2 est également fonctionnel pour les noyaux des cellules animales.

Le dispositif de sécrétion de l'ADN-T repose sur l'organisation d'un complexe de onze protéines de l'opéron VirB [28] associées à VirD4. L'assemblage des protéines de VirB est typique d'un système d'excrétion analogue à celui de la sécrétion de toxine chez *Bordetella*, et que l'on retrouve d'ailleurs chez de nombreuses bactéries pathogènes d'animaux [28]. L'assemblage de ces protéines est précédé de l'hydrolyse localisée de la paroi bactérienne par VirB1, dont une partie reste associée à d'autres protéines à l'extérieur de la paroi afin de participer à l'association avec la paroi végétale. L'organisation de la continuité avec l'édifice de polysaccharides du pseudo-pilus rétractile n'est pas encore très claire.

Ce système d'exportation de protéine a évolué chez *Agrobacterium* pour exporter des complexes nucléoprotéiques. L'énergie de transfert du complexe doit être fournie par trois protéines qui

présentent de fortes analogies avec des ATPses (VirB4, VirB1, VirD4) en association avec d'autres protéines non codées par les gènes *vir*.

Les associations fonctionnelles du complexe de protéines VirB sont assez bien connues, d'autant que VirB11 est un membre du complexe PulE répandu chez de nombreuses bactéries pathogènes (*Pseudomonas*, *Neisseria*, *Klebsiella*...), et des homologues de VirD4 sont présents dans de nombreux systèmes d'excrétion-sécrétion bactériens [28].

Une des questions qui restent encore en suspens est celle de la fonctionnalité du diamètre intérieur du pilus qui semble un peu juste pour le passage du complexe nucléoprotéique. Cette interrogation est renforcée par certains résultats qui montrent que VirE2 serait exportée seule, puis associée à l'ADN-T dans la cellule végétale. Le rôle de type chaperon des protéines VirC1 et VirE1 serait justement de favoriser l'exportation de VirE2.

La protéine VirF fonctionne également dans la plante et joue un rôle lié au cycle cellulaire de la cellule végétale réceptrice qui entraîne une spécificité d'hôte et de type cellulaire. Le rôle de VirH, analogue d'un cytochrome P450, n'est pas connu. Enfin, VirJ serait une autre protéine liée à l'ADN-T.

L'expression de l'ADN-T dans les cellules végétales

Du côté végétal, la vision des processus de transfert du complexe nucléoprotéique est beaucoup moins claire. Dans un premier temps, l'étude a été réduite aux considérations un peu disparates de «spécificité d'hôte», qui recouvraient la variabilité des réactions de différentes plantes aux inoculations expérimentales par les agrobactéries.

La sélection de mutations chez les plantes, puis leur étude, étaient évidemment beaucoup plus compliquées que l'analyse des mutations chez la bactérie. L'utilisation systématique d'*Arabidopsis thaliana*, la plante modèle de la génomique végétale, commence à donner quelques indications. La caractérisation et l'exploitation de mutants qui ne forment pas de «tumeurs», les mutants *rat* (*resistant to Agrobacterium transformation*), sur ce système modèle est à peine

débutée, mais devrait se révéler particulièrement fructueuse [29].

Depuis une quinzaine d'années, l'utilisation de gènes rapporteurs dans les constructions moléculaires intégrées dans l'ADN-T (*uidA* pour l'expression de la β -glucuronidase de *E. coli*...) a révélé deux éléments insoupçonnés jusqu'alors.

Tout d'abord, le processus de mobilisation de l'ADN-T et de fléchage vers les noyaux végétaux est très rapide. En conditions expérimentales, seulement deux heures de contact entre les bactéries et les explants végétaux suffisent pour permettre la révélation ultérieure de l'activité de la glucuronidase.

Ensuite, l'expression des gènes rapporteurs peut atteindre des niveaux importants, mais fluctuants dans le temps. Cette activité est maximale de façon transitoire, pour de nombreuses cellules, deux à trois jours après la co-culture, puis décroît progressivement dans les jours qui suivent. En culture *in vitro*, l'activité peut réapparaître après quelques semaines de culture en raison de la prolifération des quelques cellules qui ont intégré l'ADN-T de façon stable.

Ces caractéristiques d'expression suggèrent fortement que l'expression transitoire résulte de la formation d'ADN-T double brin dans les noyaux des cellules capables de synthèse d'ADN. On comprend l'attirance des agrobactéries pour les cellules «actives» au voisinage des blessures de plantes dicotylédones.

Cependant, ces ADN-T «libres» dans les noyaux semblent progressivement éliminés, et le nombre de cellules végétales qui expriment le gène rapporteur de façon stable, à la suite d'une intégration, représente seulement 1/1 000, voire 1/10 000 de celles qui l'exprimaient de façon transitoire.

La représentation que l'on se fait aujourd'hui du processus de transfert de gènes par les agrobactéries se déroule en deux actes : le ciblage vers les noyaux, très efficace, sous la dépendance de gènes bactériens, puis l'intégration dans le génome végétal, moins efficace, et qui semble dépendre de fonctions de la cellule receveuse.

Les agrobactéries ne sont donc pas au sens strict et direct les opérateurs de transfert de gènes, mais des agents de ciblage très efficace d'ADN vers

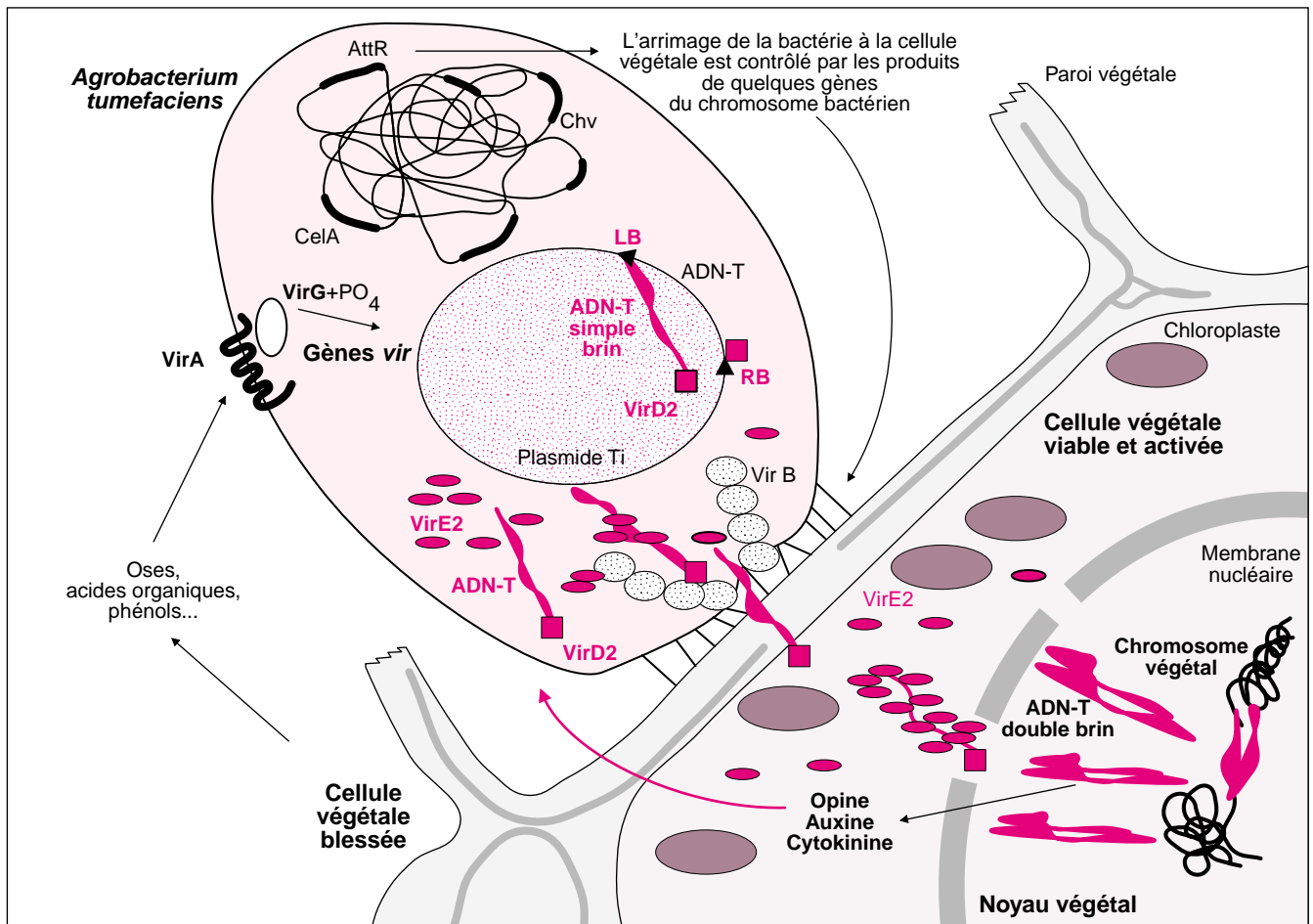


Figure 3. **Un processus naturel de transfert d'ADN.** Les agrobactéries ont développé la capacité d'exciser une portion d'un plasmide particulier (Ti), puis de l'exporter en l'adressant efficacement aux noyaux de cellules végétales. Après l'ancrage, par les produits de gènes chromosomiques, d'une agrobactérie sur la paroi d'une cellule végétale blessée, le processus de transfert fait intervenir les produits des gènes de virulence (gènes vir) portés par le plasmide Ti: (1) les nucléases (VirD) excisent l'ADN-T simple brin aux deux sites spécifiques des séquences bordures répétées (LB, left border; RB, right border); (2) les protéines de l'opéron VirB organisent le complexe d'exportation de l'ADN-T; les protéines VirD2 et VirE2 accompagnent l'ADN-T pour l'adresser aux noyaux des cellules viables autour de la blessure; (3) dans les noyaux des cellules végétales, l'ADN-T (probablement double brin) est exprimé de façon transitoire afin d'exacerber les synthèses cellulaires et surtout la production de l'opine spécifique de la souche bactérienne (source de carbone et d'azote et induction de transferts conjugatifs); plus rarement l'ADN-T peut s'intégrer dans l'ADN de la cellule, dont il provoque alors la prolifération durable, ce qui entraîne la formation de « tumeurs ».

les noyaux des plantes. Ce fléchage de nombreuses copies d'ADN-T, d'ailleurs vraisemblablement amplifiées par les cellules receveuses, met en place de manière indirecte un contexte propice à l'intégration, beaucoup plus rare, de certaines copies dans le génome receveur.

L'intégration de l'ADN-T dans le génome de la cellule végétale

Le détail de l'intégration, l'une des étapes importantes du processus de

transformation, semble contrôlé par des protéines végétales et reste encore largement incompris.

L'ADN-T s'intègre dans les séquences ouvertes de l'ADN, les zones pour lesquelles la structure de la chromatine est relaxée, probablement les zones de transcription ou de réplication actives: toutes les activités requises (hélicase, ligase, polymérase...) sont en action à proximité. Certaines mutations d'hypersensibilité aux mutagènes entraînant une résistance à la transformation par les agrobactéries, des processus de répa-

ration de l'ADN sont donc sûrement mis à contribution pour l'intégration de l'ADN-T [29]. On peut supposer que des micro-homologies servent à établir des appariements limités mais assez stables. Cependant, il n'y a pas de séquences cibles dans le génome végétal [32]. Cela est particulièrement net, et mis à profit pour l'étiquetage de gènes, chez *Arabidopsis*: il est possible de détecter des insertions d'ADN-T dans tout le génome de la plante [33].

L'intégration semble donc se produire « au hasard », entraînant une

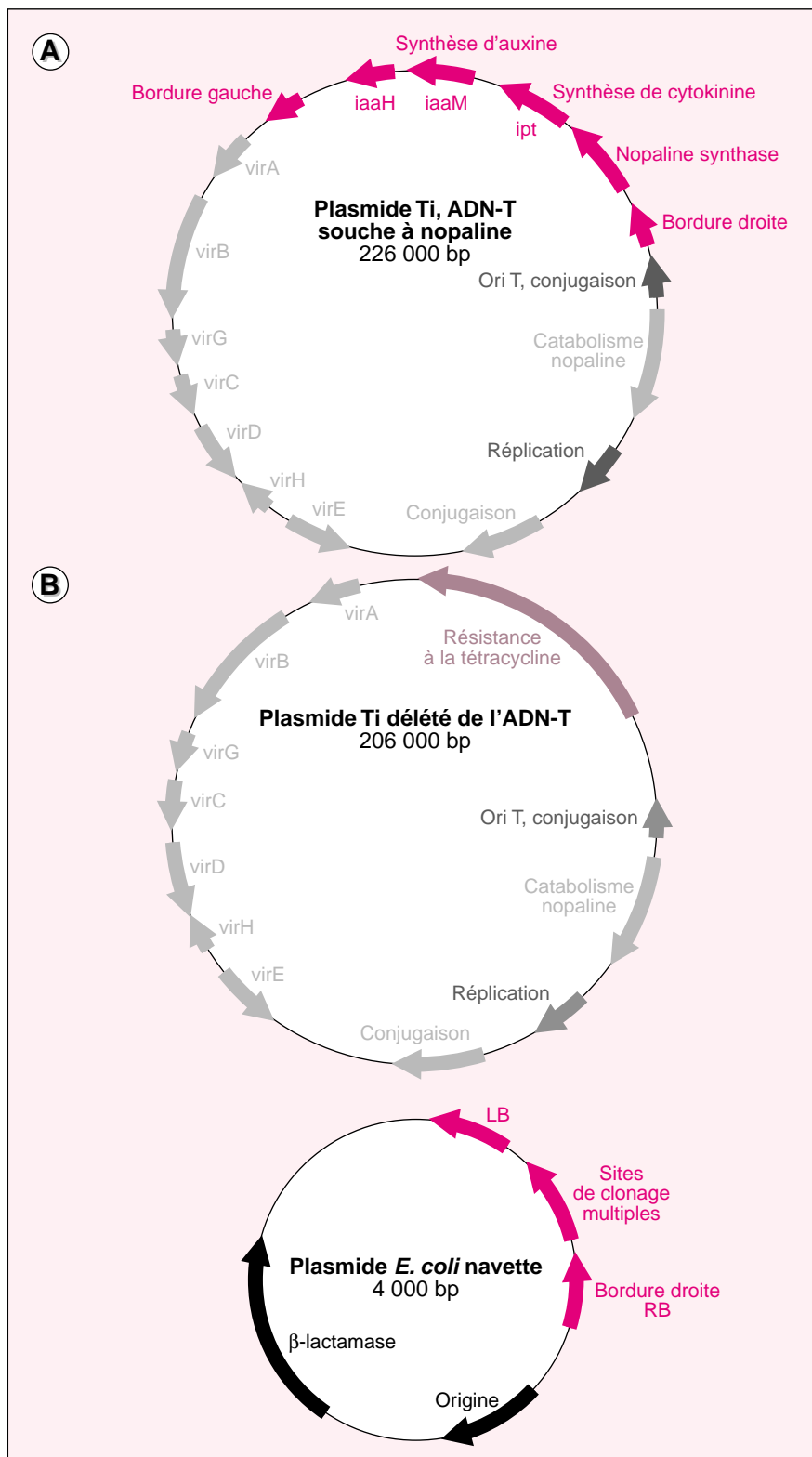


Figure 4. **Le plasmide Ti et les systèmes binaires dérivés. A. Schéma simplifié de l'organisation « naturelle » d'un plasmide Ti** (tumor inducing) d'une souche d'*Agrobacterium* à nopaline. Ce plasmide comporte : (1) les fonctions de maintien et de transfert du plasmide chez les agrobactéries ; (2) les opérons de virulence ; (3) la portion de l'ADN-T de cette souche, encadrée par les séquences bordures, comporte le gène de synthèse de la nopaline (codant pour une déshydrogénase qui catalyse la condensation de l'arginine avec l'acide α -céto-glutarique), un gène de synthèse de cytokinine (ipt, isopentényltransférase) et les gènes de synthèse de l'auxine, iaaM, dont le produit catalyse l'oxydation du tryptophane (indolylalanine) en indolylacétamide, à son tour hydrolysé par le produit de iaaH, ce qui engendre l'acide indolylacétique, c'est-à-dire l'auxine. **B. Schéma d'un système binaire.** La portion de l'ADN-T a été amputée, un gène de résistance à un antibiotique permet de sélectionner ce plasmide « désarmé ». Cependant, les gènes de virulence du plasmide Ti sont actifs et assurent le transfert lorsque les séquences bordures sont placées sur un plasmide de *E. coli* afin d'encadrer les gènes que l'on souhaite transférer aux plantes, qui peuvent être clonés aux sites choisis. Ce plasmide de *E. coli* est lui même sélectionnable et il comporte une origine de réplication fonctionnelle chez *Agrobacterium*. Il est possible de maintenir ces deux plasmides dans une souche choisie d'*Agrobacterium* de façon à combiner l'ensemble des gènes de virulence en fonction de l'espèce végétale cible.

courte délétion de l'ADN de l'hôte au site d'insertion [32]. La bordure gauche de l'ADN-T est souvent moins bien conservée que la bordure droite,

qui est protégée par VirD2. L'arrimage par une ligase de l'extrémité 5' de l'ADN-T à l'extrémité 3' de l'ADN de la plante constitue l'une des étapes

cruciales de l'intégration. Le rôle de VirD2 dans cette étape ne semble pas déterminant, car en essais *in vitro* cet arrimage est plus efficace lorsque VirD2 n'est pas en place [34]. L'intégration à partir de nucléoprotéines doit faire intervenir d'autres interactions protéiques : on a récemment montré que l'histone H2A interagit avec VirD2 [29]. Il reste bien sûr à comprendre le rôle des différentes protéines Rat, dont on suspecte le rôle dans les mécanismes de « compétence » de transformation par les agrobactéries.

En résumé, l'intégration semble effectivement contrôlée par des fonctions végétales, dont la nature et le rôle restent à déterminer.

La domestication des agrobactéries

À la fin des années 1970, de nombreux laboratoires sont déjà coutumiers, non seulement de l'utilisation expérimentale des agrobactéries, mais aussi des procédés de clonage cellulaire chez les végétaux. Cela explique la rapidité de mise en pratique de la connaissance progressive des mécanismes du transfert de l'ADN-T.

Par rapport aux autres procédés de transfert de gènes (Tableau I), plusieurs aspects essentiels des plasmides Ti sont mis à profit dans les utilisations expérimentales. Nous l'avons vu, le mécanisme de ciblage est particulièrement efficace. Il faut avoir également à l'esprit les rapports de populations entre bactéries et cellules végétales receveuses: en inoculation expérimentale, des dizaines, voire des milliers d'agrobactéries « ciblent » leur ADN-T vers la même cellule!

La portion transférée – l'ADN-T – ne comporte aucun gène impliqué directement ni dans le transfert, ni dans l'intégration. Entre les deux séquences « bordures » – seuls éléments indispensables –, il est possible de remplacer les gènes naturels de l'ADN-T par les séquences que l'on veut faire exprimer dans la cellule végétale (cela évite de provoquer les proliférations dues à l'expression des gènes de synthèse de substances de croissance).

Enfin, les nucléases spécifiques (VirD1 et VirD2) sont efficaces sur ces séquences bordures de 24 paires de bases, quelle que soit leur position. Il est donc possible de transférer ces séquences dans des plasmides de *E. coli*, plus petits, parfaitement connus et beaucoup plus faciles à utiliser que les « gros » plasmides Ti.

En pratique, le dispositif (qualifié de binaire) le plus généralement utilisé repose ainsi sur l'utilisation de deux plasmides (figure 4). Ce dispositif a engendré de larges panoplies de vecteurs qui combinent différentes associations de trois éléments sélectionnables:

– la « souche » bactérienne « porteuse », dont le chromosome comporte les quelques gènes de virulence dont les produits contrôlent les fonctions d'arrimage, ainsi que la résistance naturelle à la rifampicine;

– un plasmide Ti, qui comporte l'essentiel des gènes de virulence naturels, spécifiques d'une souche donnée (il peut provenir d'une autre souche). Ce plasmide est amputé de l'ADN-T, y compris des séquences bordures. Il comporte également un gène bactérien sélectionnable (résistance antibiotique);

– un plasmide de *E. coli* qui apporte – outre des fonctionnalités classiques (origine de réplication, sites de clonage, et marqueur de sélection) – deux éléments spécifiques: l'origine de réplication qui doit être fonctionnelle chez *E. coli* mais également dans les agrobactéries, et les séquences bordures de l'ADN-T qui doivent encadrer les sites de clonage. Les constructions moléculaires destinées aux végétaux comportent des « gènes-outils » classiques (rapporteur, sélection) auxquels s'ajoutent les résistances aux herbicides (antibiotiques particuliers), ainsi bien entendu que les gènes dont on veut étudier le rôle et le contrôle.

Les procédés de mise en œuvre des agrobactéries ainsi modifiées dérivent directement des procédés classiques d'inoculation expérimentale de la galle du collet. Les bactéries « porteuses » sélectionnées par culture *in vitro* sur les milieux appropriés, sont co-cultivées avec des fragments végétaux qui peuvent être variés. Les plus fréquemment utilisés concernent les feuilles [35], organes minces et dont on contrôle généralement bien le développement *in vitro* jusqu'à la régénération de plantes.

Après la phase de contact ou de co-culture de quelques heures à quelques jours, les explants sont repiqués sur des milieux comportant des antibiotiques, sans effet sur les cellules végétales, afin d'éliminer les bactéries porteuses. Les milieux successifs, jusqu'à l'obtention de plantes enracinées, comportent également les agents de sélection appropriés pour les caractères que l'on souhaite transférer aux cellules végétales.

Tout dernièrement, c'est un système binaire de ce type qui a permis de

montrer que le dispositif de transfert de l'ADN-T était efficace chez les cellules humaines en culture (cellules HeLaR19, rénale HEK 293 et neuronale PC 12), du moins autant que la précipitation par le phosphate de calcium [11]. Les séquences de l'ADN-T comportaient des séquences de contrôle, efficaces dans un contexte animal, telles que que le promoteur précoce du virus SV 40. Le ciblage correct vers les noyaux n'est pas étonnant, mais, en revanche, la surprise résulte de la capacité des agrobactéries de s'arrimer aux cellules animales, ce qui implique que les protéines cibles soient conservées.

Pour les plantes, l'efficacité de ces systèmes a conduit à un foisonnement extraordinaire d'utilisations pratiques ou expérimentales chez de nombreuses espèces. Cependant, la majorité des plantes monocotylédones, dont les céréales, restait réfractaire à la transformation par les agrobactéries. Cette limitation importante avait conduit au développement de procédés de transfert direct, mais également à mieux affiner encore l'utilisation des agrobactéries.

L'étude de plasmides Ti qualifiés de « super-virulents », en raison de l'efficacité de la formation de « tumeurs » sur une large gamme d'espèces végétales, a récemment fourni des possibilités supplémentaires. Ainsi, la sur-expression de VirG, la protéine inductrice de la transcription des autres gènes de virulence, couplée à l'utilisation d'acéto-syringone (phénol inducteur de l'auto-phosphorylation de VirA) dans le milieu de co-culture, permettaient d'induire des transformants chez des espèces réfractaires [36].

La transformation des céréales est désormais possible, en forçant expérimentalement l'induction du système à deux composants (VirA/VirG) et surtout en utilisant des cellules cibles en division (suspensions embryogènes ou embryons immatures cultivés *in vitro*) [37].

Tout dernièrement sont apparus des systèmes de plasmides ternaires, par l'adjonction, dans les souches « porteuses », d'un plasmide supplémentaire, compatible avec *E. coli*, portant un gène *virA* mutant dont l'expression est constitutive [38].

Perspectives

Parmi les différents procédés de transfert de gènes aux végétaux, l'utilisation des agrobactéries représente de très loin le processus le plus utilisé en raison de trois caractéristiques favorables.

Les raffinements expérimentaux récents permettent de surmonter les limitations naturelles du spectre d'hôtes: aujourd'hui, pratiquement toutes les espèces végétales sont transformables.

Les processus de transfert et de ciblage des séquences encadrées par les séquences bordures de l'ADN-T sont très efficaces. Cette caractéristique favorise les situations les plus propices aux événements d'insertion stable.

Les séquences bordures de l'ADN-T permettent généralement de mieux contrôler la portion d'ADN effectivement insérée dans le génome receveur, même si la reconnaissance des sites spécifiques par les nucléases n'est pas systématiquement efficace [39].

Globalement, le transfert d'ADN par les agrobactéries constitue aujourd'hui le procédé de génie génétique le plus fiable, mais également, et surtout, le plus perfectible. Ainsi, la caractérisation des gènes des plantes dont les produits président à l'intégration des transgènes est en cours, justement en raison de l'étiquetage dû à l'efficacité des agrobactéries chez une plante modèle, dont le génome est aujourd'hui entièrement séquencé [1]. Dans ces prolongements, il est possible d'envisager d'accéder à la caractérisation des mécanismes de recombinaison homologue chez les plantes supérieures. Ces événements se produisent dans les processus actuels avec une fréquence bien plus faible – de l'ordre de 100 000 fois inférieure – de celle des recombinaisons illégitimes [40]. Clairement, la recombinaison homologue représente un outil fondamental qui fait lourdement défaut dans les démarches de génomique fonctionnelle chez les végétaux.

La « saga » des agrobactéries, que nous venons de survoler, met en lumière le « sens de l'accueil » du génome végétal, déjà largement attesté par ce que l'on connaît de l'évolution des génomes végétaux [41].

Cette assez grande souplesse du génome végétal recouvre vraisemblablement des différences importantes de fonctionnement avec celui des génomes des animaux. En restant sur cette idée de « souplesse génomique », il faut rappeler que les séquences « naturelles » de l'ADN-T comportent des séquences de contrôle de type végétal, dont certaines contiennent des introns [42], d'où l'hypothèse de l'origine eucaryotique de ces gènes bactériens. L'histoire de la domestication des agrobactéries révèle l'imbrication permanente entre recherches fondamentales et investigations plus finalisées: mis en route pour des préoccupations de santé des plantes, les travaux sur ces bactéries « pathogènes » du sol ont davantage porté sur les substances de croissance, donc sur des aspects fondamentaux de biologie végétale, puis sur l'idée assez forte que ces bactéries joueraient un rôle dans le génie génétique...

Juste retour au rôle pathogène, les caractéristiques du transport de l'ADN-T, surtout leur extraordinaire flexibilité, pourraient procurer des dispositifs pour l'étude de certains des mécanismes de la virulence de bactéries pathogènes pour les animaux.

Enfin, l'efficacité du transfert de l'ADN-T pour les cellules animales constitue, s'il en est encore besoin, une preuve supplémentaire de la conservation fonctionnelle de certains mécanismes hérités d'un lointain ancêtre commun des plantes et des animaux ■

RÉFÉRENCES

1. The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000; 408: 796-815.
2. Potrykus I. Gene transfer to plants: assessment and perspectives. *Physiol Plant* 1990; 79: 125-34.
3. Herrera-Estrella L, Depicker A, Van Montagu M, Schell J. Expression of chimeric genes transferred into plants cells using a Ti plasmid-derived-vector. *Nature* 1983; 303: 209-13.
4. Pazkowski J, Shillito RD, Saul M, Mandak V, Hohn B, Potrykus I. Direct gene transfer to plants. *EMBO J* 1984; 3: 2717-22.
5. Caboche M, Deshayes A. Utilisation de liposomes pour transformation de protoplastes de mésophylle de tabac par un plasmide de *E. coli* leur conférant la résistance à la kanamycine. *CR Acad Sci Paris* 1985; 299: 663-6.
6. Morikawa H, Yamada Y. Capillary microinjection into protoplasts and intranuclear localization of injected materials. *Plant Cell Physiol* 1985; 26: 229-36.
7. Fromm ME, Taylor LP, Walbot V. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* 1986; 319: 791-3.
8. Neuhaus G, Spangenberg G, Sheid OM, Schweiger HG. Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryoids. *Theor Appl Genet* 1987; 70: 30-6.
9. Sanford JC. The biolistic process. *Trends Biotechnol* 1988; 6: 299-302.
10. D'Halluin K, Bonne E, Bossut M, De Beuckeller M, Leemans J. Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell* 1992; 4: 1495-505.
11. Kunik T, Tzfira T, Kapulnik Y, Gafni Y, Dingwall C, Citovsky V. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 1871-6.
12. Morel G, Martin C. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *CR Acad Sci Paris* 1952; 235: 1324-5.
13. Autran D, Traas J. Organisation et fonctionnement des cellules souches végétales: le méristème apical d'*Arabidopsis*. *Med Sci* 2001; 17: 836-44.
14. Dinant S. Des ponts entre les cellules végétales. *Biofutur* 2000; 201: 36-41.
15. Skoog F, Miller CO. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* 1957; 11: 118-30.
16. Chupeau MC, Chupeau Y. Regeneration of plants from protoplasts of *Populus* species (poplars). In: Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Berlin: Springer Verlag, 1996; 38: 129-38.
17. Chupeau MC, Maisonneuve B, Bellec Y, Chupeau Y. A lactuca universal hybridizer and its use in creation of fertile interspecific somatic hybrids. *Mol Gen Genet* 1994; 245: 139-45.
18. Ouellette MM, Savre-Train I. Les télomères et le vieillissement des cellules. *Med Sci* 2000; 16: 473-80.
19. Smith EF, Townsend CO. A plant tumor of bacterial origin. *Science* 1907; 25: 671-3.
20. White PR, Braun AC. Crown-Gall production by bacteria-free tumor tissues. *Science* 1941; 94: 239-341.
21. Braun AC. Thermal studies on the factors responsible for tumor induction in crown-gall. *Am J Bot* 1947; 34: 234-40.
22. Goldmann A, Tempé J, Morel G. Quelques particularités de diverses souches d'*Agrobacterium tumefaciens*. *CR Seances Soc Biol* 1968; 162: 630-1.

RÉFÉRENCES

23. Petit A, Tourneur J. Perte de virulence associée à la perte d'une activité enzymatique chez *Agrobacterium tumefaciens*. *CR Acad Sci Paris* 1972; 275: 137-9.
24. Schilperoort RA, Veldstra H, Warnaar SO, Mulder G, Cohen JA. Formation of complexes between DNA isolated from tobacco crown-gall tumors and complementary to *Agrobacterium tumefaciens* DNA. *Biochim Biophys Acta* 1967; 145: 523-5.
25. Cohen SN, Miller CA. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria. II Molecular nature of R-factor isolated from *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1970; 50: 671-87.
26. Van Lerebecke N, Genetello C, Schell J, Schilperoort RA, Hermans AK, Hernalsteens JP, Van Montagu M. Acquisition of tumor inducing ability of non oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. *Nature* 1975; 255: 742-3.
27. Bundock P, Hooykaas P. Interaction between *Agrobacterium tumefaciens* and plant cells. In: Romeo JT, et al., eds. *Phytochemical signals and plant-microbes interactions*. New York: Plenum Press, 1998: 207-29.
28. Zupan J, Muth TR, Draper O, Zambryski P. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J* 2000; 23: 11-28.
29. Gelvin SB. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Ann Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol* 2000; 51: 223-56.
30. Depicker A, Satchel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet* 1982; 1: 561-73.
31. Petit A, Tempé J, Kerr A, Holster M, Van Montagu M, Schell J. Substrate induction of conjugation activity in *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids. *Nature* 1978; 271: 570-2.
32. Tinland B. The integration of T-DNA into plant genome. *Trends Plant Sci* 1996; 1: 178-84.
33. Bechtold N, Jaudeau B, Jolivet S, Maba B, Vezon D, Voisin R, Pelletier G. The maternal chromosome set is the target of the T-DNA in the *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 2000; 155: 1875-87.
34. Ziemienowicz A, Tinland B, Bryant J, Gloeckler V, Hohn B. Plant enzymes but not *Agrobacterium* VirD2 mediate T-DNA ligation *in vitro*. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 6317-22.
35. Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eicholtz D, Rogers SC, Fraley RT. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 1985; 227: 1229-31.
36. Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 1994; 6: 271-82.
37. Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat Biotech* 1996; 14: 745-50.
38. Van der Fits L, Deakin EA, Hoge JH, Memelink J. The ternary transformation system: constitutive *virG* on a compatible plasmid dramatically increases *Agrobacterium* mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 2000; 43: 495-502.
39. De Buck S, De Wilde C, Van Montagu M, Depicker A. T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol Breed* 2000; 6: 459-68.
40. Kempin SA, Liljegren SJ, Block LM, Roundsley SD, Yanofsky MF. Targeted disruption in *Arabidopsis*. *Nature* 1997; 389: 802-3.
41. Lang BF, Paquin B, Burger G. L'évolution moléculaire et la révolution génomique. *Med Sci* 2000; 16: 212-8.
42. Magrelli A, Langenkemper K, Dehio C, Schell J, Spena A. Splicing of the *rolA* transcript of *Agrobacterium rhizogenes* in *Arabidopsis*. *Science* 1994; 266: 1986-8.

TIRÉS À PART

Y. Chupeau.

Summary

Soil bacterium's sexual refinement : in the genetic engineering' service

Initially characterized as the agents responsible for plant « tumor » formation, agrobacteria have evolved a type IV secretion system to export a specific segment of a particular plasmid and address it to plant nuclei. Over the last century, the conjunction of research in plant pathology, cell biology, and ultimately in microbiology, led to the understanding of the process of gene transfer. In the natural process, the genes transferred to the plant create a metabolic pathway for the benefit of the bacteria. Once understood, this process has been diverted by biologists to provide a technique of gene transfer, which has become the most widely used for plants. However, it remains to unravel the details of the mechanism of integration of the bacterial DNA in the host genome.