

CHAPITRE V

Agrobacterium tumefaciens et le transfert des gènes aux plantes

1. Généralités sur le genre *Agrobacterium*

Les bactéries du genre *Agrobacterium* sont présentes dans le sol Gram négatif, en forme de bâtonnet, mobiles, aérobies strictes. Ce genre appartient à la famille des *Rhizobioaceae*, elle même incluse dans la classe des alpha-protéobactéries au sein du phylum des proteobactéries.

Agrobacterium tumefaciens (récemment renommée *Rhizobium radiobacter*) et *Agrobacterium rhizogenes* sont deux espèces phytopathogènes de la rhizosphère.

- *A. rhizogenes* responsable du hairy root, maladie caractérisée par la naissance d'un chevelu racinaire au point d'infection.

- *A. tumefaciens* est responsable d'une maladie nommée galle du collet ou crown-gall, qui se traduit par la formation d'une tumeur au site d'infection. La maladie de la galle de collet a été observée chez la vigne depuis 1850, elle se caractérise par la formation de galles volumineuses (tumeurs ou broussins chez la vigne) au collet entre la tige et la racine d'un grand nombre de Dicotylédones. Ces tumeurs au site d'infection sont provoquées à la suite de blessures variées (mécaniques, gels, ect.).

2. Colonisation des plantes par *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium est une bactérie capable de transformer génétiquement une cellule végétale. Elle est attirée par des composés phénoliques dégagés par les plantes dicotylédones vers le site de la blessure. *Agrobacterium* contient un plasmide Ti (tumor-inducing), dont une partie dite T-DNA est transférée à la cellule végétale atteinte et s'intègre à son génome (Figure 3). Les gènes portés par l'ADN-T s'expriment et provoquent la synthèse de composés spécifiques, tels que :

- les hormones de croissance végétales, l'auxine, et une cytokinine, dont la surproduction entraîne une multiplication anarchique des cellules végétales, d'où formation de la tumeur.

- les opines, qui sont particulièrement catabolisées par la bactérie *Agrobacterium* qui induit la formation de la tumeur et sont pour elle source de carbone, d'azote et d'énergie. Cette spécificité est liée au fait que les gènes déterminant l'utilisation des opines sont portés par le plasmide Ti. La présence des opines dans la tumeur favorise la croissance des pathogènes et concourt à leur dissémination.

L'interaction *Agrobacterium* - plante peut par conséquent être vue comme une manipulation génétique naturelle durant laquelle la bactérie détourne à son profit l'activité métabolique de la plante.

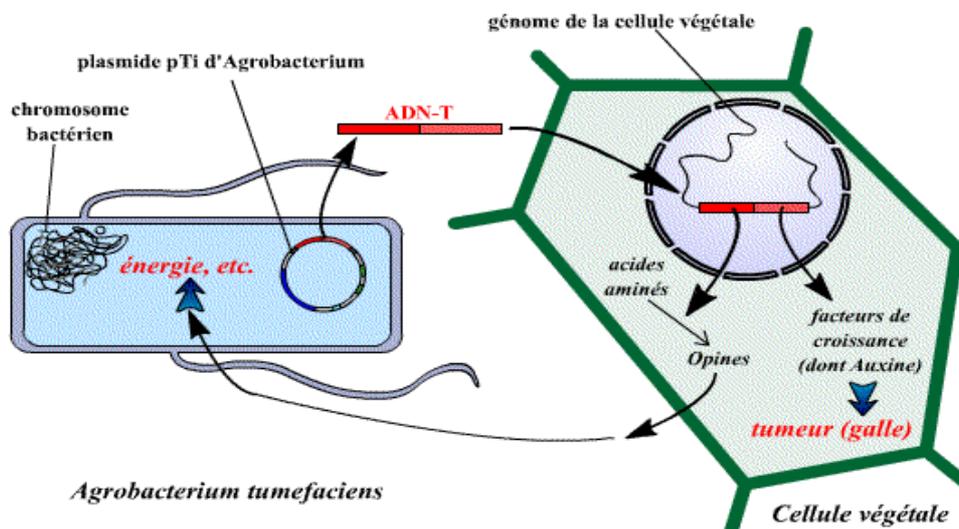


Figure 3 : Le transfert naturel d'ADN-T dans le génome d'une cellule végétale

3. Plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*

Le plasmide Ti est un petit plasmide, de 215 milliers de paires de bases. Ce plasmide comporte plusieurs régions (Figure 4):

a- ADN-T : région transférée de la bactérie à la cellule végétale.

- Cette région est flanquée de deux zones de bordures (FD à droite et FG à gauche), importantes pour la réalisation du transfert.

- L'ADN-T comporte une région permettant le développement de la tumeur (galle) chez la plante infectée.

- L'ADN-T comporte aussi les gènes permettant la synthèse et la libération des opines par les cellules végétales.

b- VIR : région de virulence, Cette région comporte une série de gènes, qui permettent la fixation de la bactérie aux cellules végétales et le transfert de l'ADN-T.

c- OCC : région de catabolisme des opines, Cette région permet à la bactérie d'utiliser les opines libérées par le végétal suite à son infection par l'ADN-T.

d- ORI : région de réplication, Cette région permet au plasmide de se multiplier dans la bactérie.

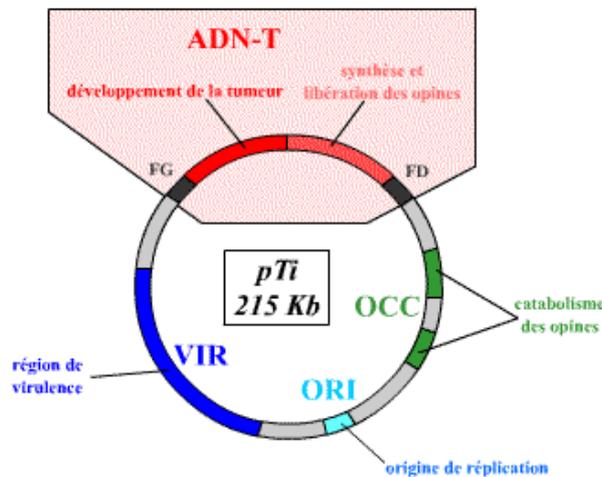


Figure 4 : Le plasmide Ti

4. Transgénèse végétale

La transgénèse consiste en une introduction artificielle d'un gène étranger provenant d'une espèce donneuse dans le matériel génétique d'une autre espèce receveuse.

- l'organisme obtenu est un organisme transgénique, appelé organisme génétiquement modifié (OGM).
- le gène transféré est appelé transgène ou gène d'intérêt. L'introduction de ce gène conduit à la production de protéines qui confèrent de nouveaux caractères à l'organisme génétiquement modifié.

L'intérêt des OGM réside dans les propriétés que nous pouvons leur apporter et qui visent à améliorer par exemple la culture d'une plante, ou ses qualités nutritives. Les gènes les plus souvent retrouvés chez les OGM sont généralement de résistance à un antibiotique, à un désherbant ou à une toxine, ect...

4.1. Réalisation de la construction génétique

Une construction génétique est une séquence d'ADN destinée au transfert dans une cellule, comprenant un gène d'intérêt, les séquences promotrices et régulatrices indispensables à son expression et à sa régulation dans la cellule receveuse et un gène marqueur (gène de sélection, GS). Tous ces fragments de gènes d'origines différentes, gènes d'intérêt, gènes marqueurs et signaux, sont assemblés *in vitro*. On obtient ainsi la construction génétique qui est multipliée puis utilisée pour l'étape de transformation.

a) Identifier, isoler, et multiplier un gène d'intérêt

- Le gène d'intérêt peut provenir de tout organisme vivant, plante, animal ou bactérie puisque le code génétique est universel. La construction d'un transgène débute par le repérage d'un caractère intéressant et l'identification de la protéine responsable de ce caractère, puis du gène codant pour cette protéine. C'est ce gène d'intérêt qui sera isolé à l'aide d'enzymes de restriction.

b) Intégrer le gène d'intérêt dans une construction génétique : Le gène d'intérêt seul ne peut pas s'exprimer dans la cellule végétale.

- **Les séquences régulatrices (signaux) :** La présence d'un promoteur devant la séquence codante du gène d'intérêt est indispensable. C'est une séquence située en amont du gène, responsable de la transcription de l'ADN. Une séquence terminateur est également indispensable, située en aval, elle signale la fin de la séquence codante.

- **le gène marqueur :** permet de sélectionner les cellules qui ont intégré le gène d'intérêt. Il peut s'agir par exemple de gènes marqueurs de résistance à des antibiotiques ou à des herbicides.

La construction génétique (constituée de fragments de gènes d'origines différentes, gène d'intérêt, gène marqueur et signaux sont assemblés in vitro) est multipliée puis utilisée pour l'étape de transformation.

c) Multiplication de la construction génétique : le clonage

- Insertion de la construction génétique dans un plasmide (plasmide recombiné)

- le plasmide recombiné utilisé comme vecteur de clonage et réintégré dans la bactérie *Escherichia coli*. Par culture de cette bactérie, on obtient une multiplication rapide du plasmide.

4.2. Transfert naturel de la construction génétique par *Agrobacterium tumefaciens*

Actuellement, le transfert naturel ou biologique de gènes, à l'aide d'*Agrobacterium*, est utilisé pour transformer les végétaux. *A. tumefaciens* est la bactérie la plus employée. Le principe est de modifier son plasmide Ti afin qu'il n'y ait pas de formation de la galle du collet, mais qu'il y ait transfert et intégration des gènes désirés dans le génome des plantes. Le plasmide vecteur est transféré d'*E. coli* à *A. tumefaciens* par choc thermique ou par conjugaison. Ainsi des plasmides Ti désarmés (sans l'ADN-T) sont construits. L'ADN-T responsable du pouvoir pathogène de la bactérie (cause la galle de collet) est remplacé par la construction génétique portant le gène d'intérêt. Les séquences bordures de l'ADN-T qui délimitent le segment d'ADN (ADN-T) et les gènes de virulence sont conservés dans le plasmide pour permettre le transfert de l'information génétique dans la cellule végétale.

4.3. Transformation biologique par *Agrobacterium*

Dans un milieu de culture commun des bactéries *A. tumefaciens* modifiées et des fragments des tissus végétaux appelés explants. Grâce aux propriétés de la bactérie, la partie du plasmide qui contient le gène d'intérêt est transféré dans le noyau de la cellule végétale qui l'intègre alors dans son génome. C'est à partir des explants que la plante modifiée se développera. Les modifications génétiques apportées aux explants sont le plus souvent invisibles à l'œil nu. Pour sélectionner les cellules qui sont effectivement transformées, on apporte dans la culture des explants un agent sélectif approprié : herbicide, antibiotique, etc... Seules les cellules végétales transformées, c'est-à-dire celles possédant et exprimant le gène marqueur de sélection, soit de résistance à un herbicide, soit de résistance à un antibiotique, pourront se développer. Cette technique de transformation par *Agrobacterium* a été appliquée avec succès à différentes espèces végétales dont le colza, la tomate, la pomme de terre, le soja, le tabac, le maïs, etc.