

Transformation par *Agrobacterium*



Les bactéries du genre *Agrobacterium* (bacille Gram -, aérobie strict, famille des *Rhizobiacées*) sont dans la nature, avant tout, des pathogènes des végétaux supérieurs.



Agrobacterium tumefaciens est l'agent causal des tumeurs du collet (crown gall).



Agrobacterium rhizogenes provoque le syndrome du chevelu racinaire (hairy root).

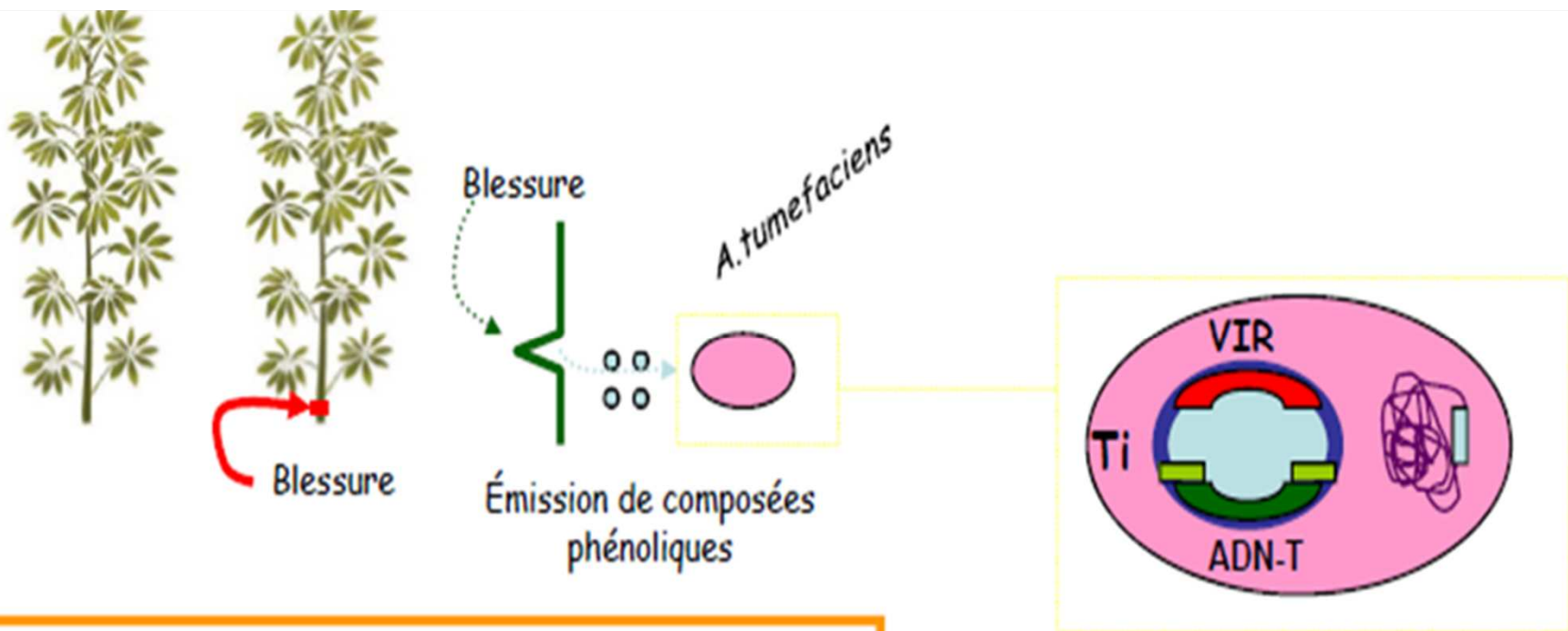
Ces bactéries sont attirées par les composés phénoliques dégagés par les plantes dicotylédones lorsqu'elles sont blessées.

Au niveau de cette blessure, *Agrobacterium* est capable de se fixer sur les cellules du végétal.

A la suite de ce contact, ces cellules végétales se multiplient de manière importante, donnant naissance à une formation tumorale ou à une multiplication anarchique des racines (selon le cas).

C'est par l'étude de ces infections qu'a été découverte la propriété qu'ont ces bactéries de transférer une partie de leur ADN dans le noyau de certaines cellules végétales.





Expression des gènes de l'ADN-T par la plante
Onc (aux et cyto) et nutrition opine

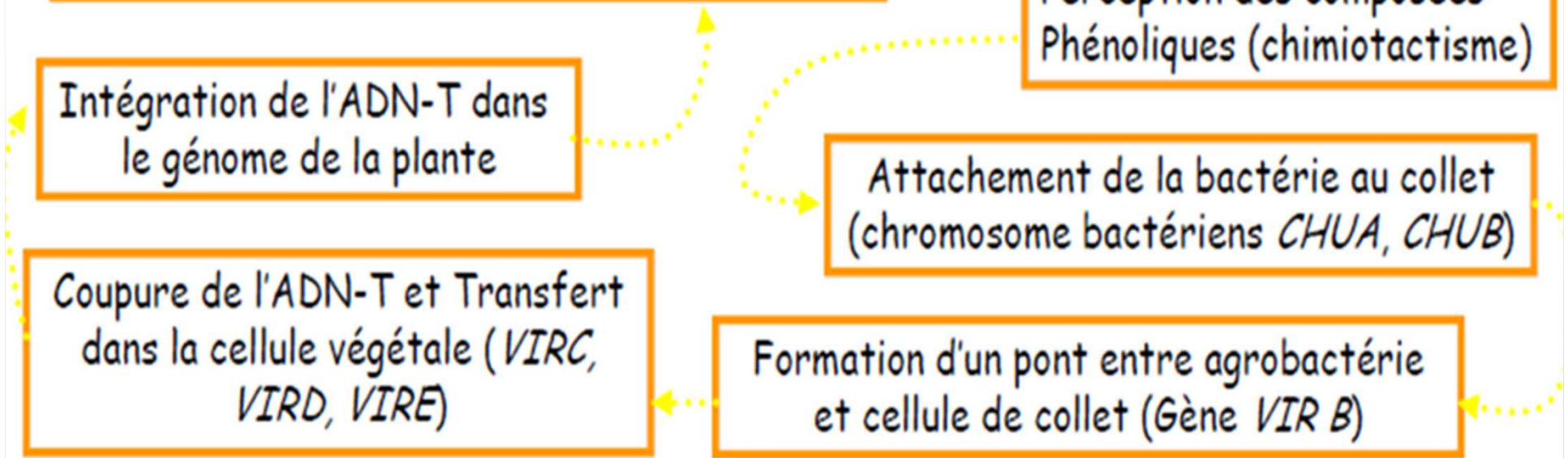
Perception des composées Phénoliques (chimiotactisme)

Intégration de l'ADN-T dans le génome de la plante

Attachement de la bactérie au collet (chromosome bactériens *CHUA*, *CHUB*)

Coupage de l'ADN-T et Transfert dans la cellule végétale (*VIRC*, *VIRD*, *VIRE*)

Formation d'un pont entre agrobactérie et cellule de collet (Gène *VIR B*)



L'ADN ainsi transféré, ou **ADN-T**, est un fragment de quelques milliers de paires de bases, délimité à chaque extrémité par des bordures constituées de la même séquence de 25 pb.

Cet **ADN-T** code pour:

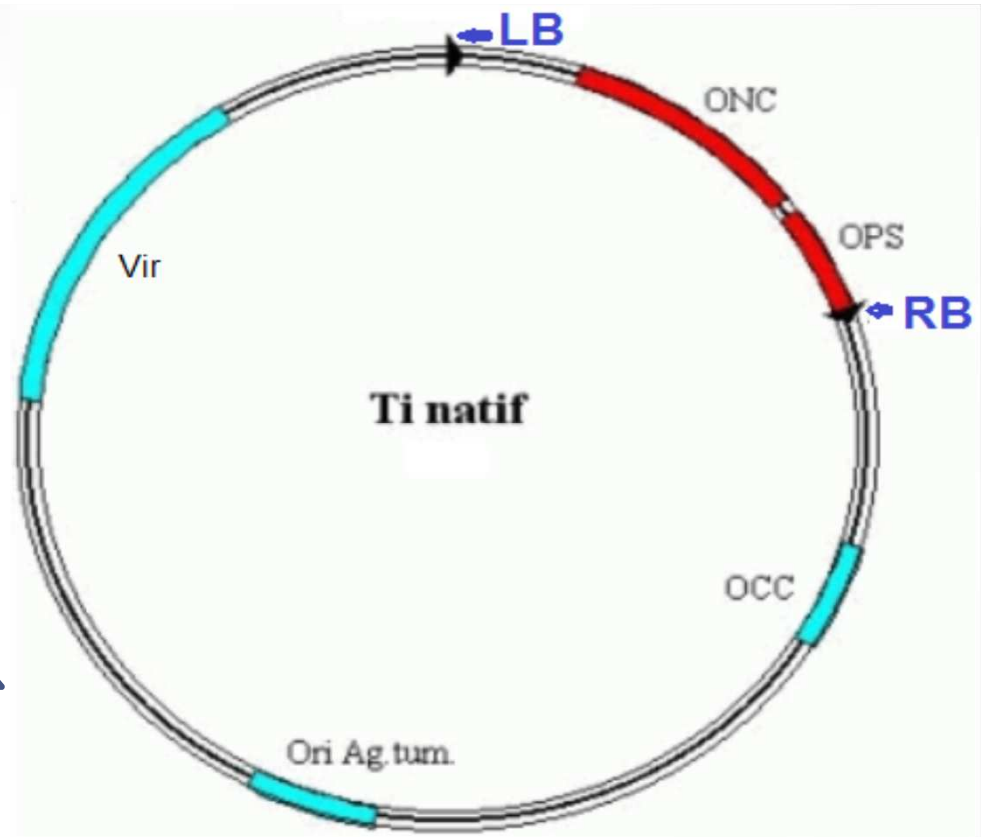
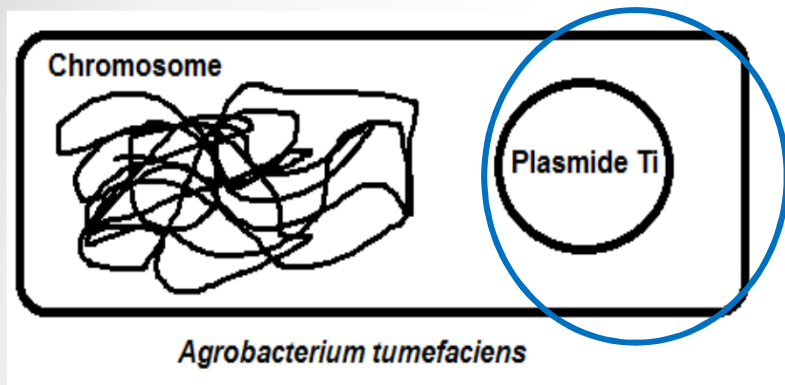
- Des gènes de synthèse d'**opines**: substrat nutritif aminocarboné des bactéries.
- Des gènes de biosynthèse de **substances de croissance végétale** : auxines + cytokinines responsables de la formation des tumeurs et de la prolifération anarchique des racines.

Il est contenu(l'ADN-T) dans un plasmide qu'on appelle selon le cas:

- Plasmide **Ti** pour «Tumor inducing»: Cas de *Agrobacterium tumefaciens*.
- Plasmide **Ri** pour « root inducing » : Cas de *Agrobacterium rhizogenes*.

•

•



Ori Ag. Tum: Origine de réplication.

Vir : fonction de virulence responsable du transfert de l'ADN-T.

OCC: Fonction de dégradation des opines

ADN en rouge: Partie transférée ne s'exprimant que dans la cellule végétale: **ONC**: gène responsable de l'oncogénicité, **OPS**: gène codant une opine.

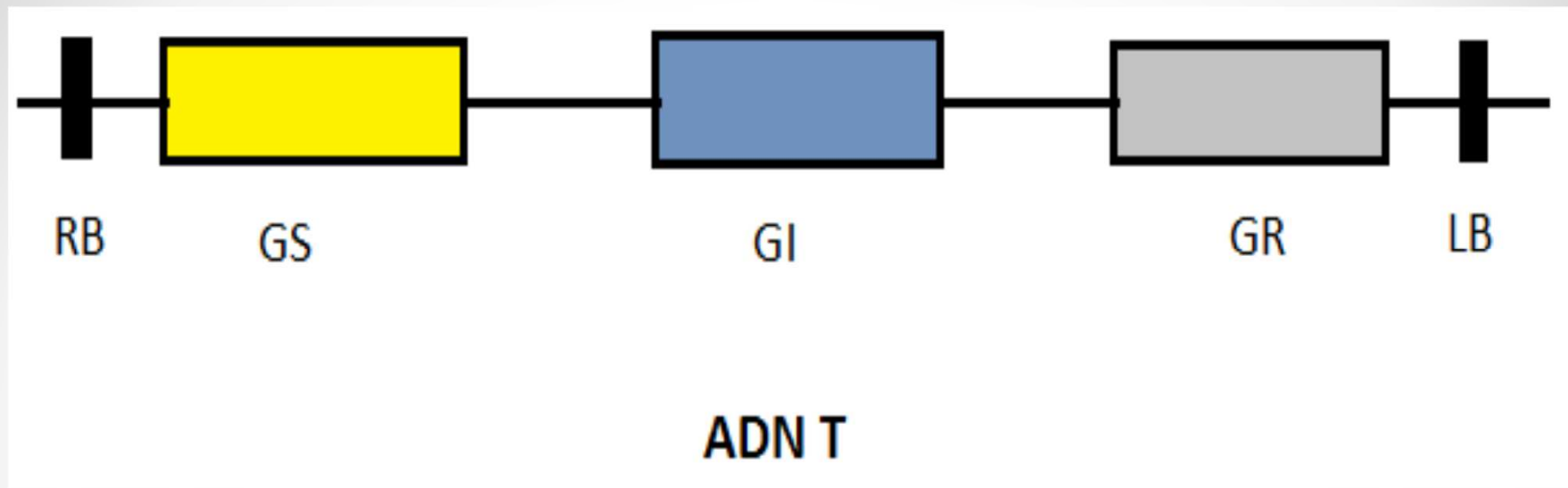
LB: Bordure gauche, **RB**: Bordure droite.

Le transfert du matériel génétique, qui met en jeu une batterie très importante de gènes de la bactérie, n'est conditionné, au niveau de l'ADN-T, que par l'existence de ses frontières droite et gauche.

Cette propriété permet d'insérer entre ces bordures et à la place des gènes portés par l'ADN-T, n'importe quel séquence d'ADN.

Un tel plasmide est dit « désarmé » car il a perdu tout pouvoir pathogène.





La construction la plus simple implique:

- Un gène d'intérêt (**GI**).
- Un gène pour la sélection des cellules végétales transformées (**GS**).
- Un gène rapporteur (**GR**).

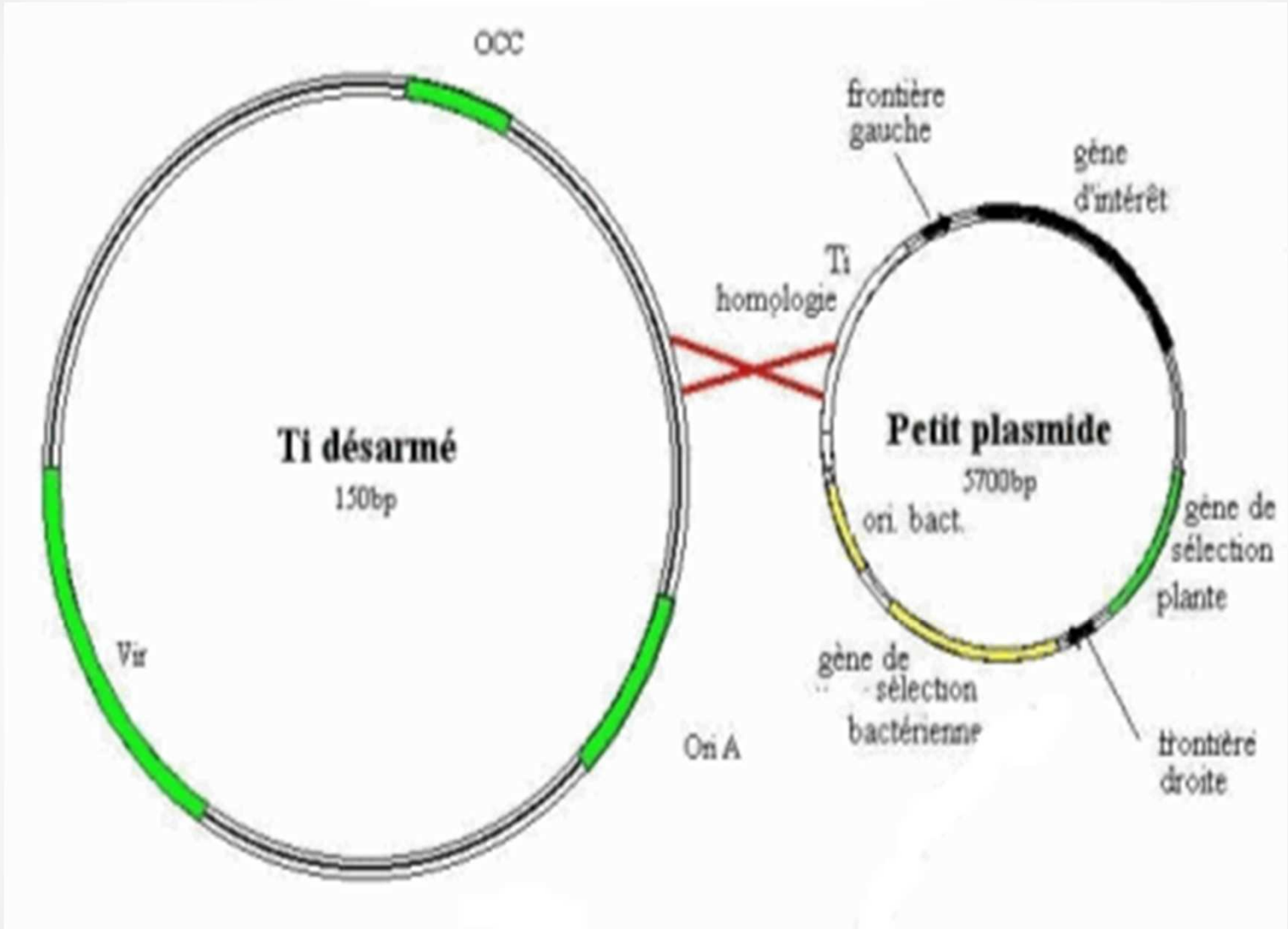
Le plasmide Ti est une molécule dont la taille est d'environ 200 Kb ce qui le rend difficilement manipulable *in vitro*.

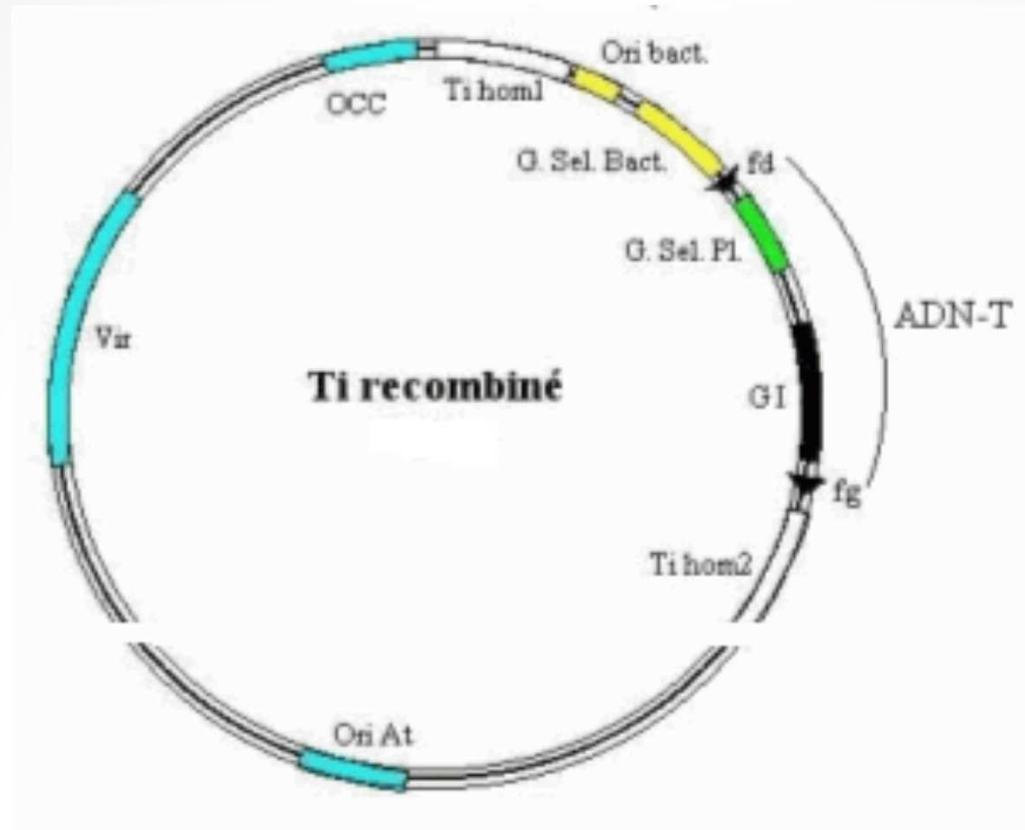
La construction génétique est alors réalisée dans un petit plasmide capable de se multiplier dans *E.coli*.

Ce plasmide est ensuite introduit par conjugaison ou par transformation dans *Agrobacterium* où il va intégrer par homologie le plasmide Ti (désarmé) dans une séquence se trouvant entre les frontières droite et gauche de l'ADN-T.

•

•





Un événement de recombinaison permet de faire la somme des deux plasmides et d'obtenir un plasmide navette *Agrobacterium-E.coli*.

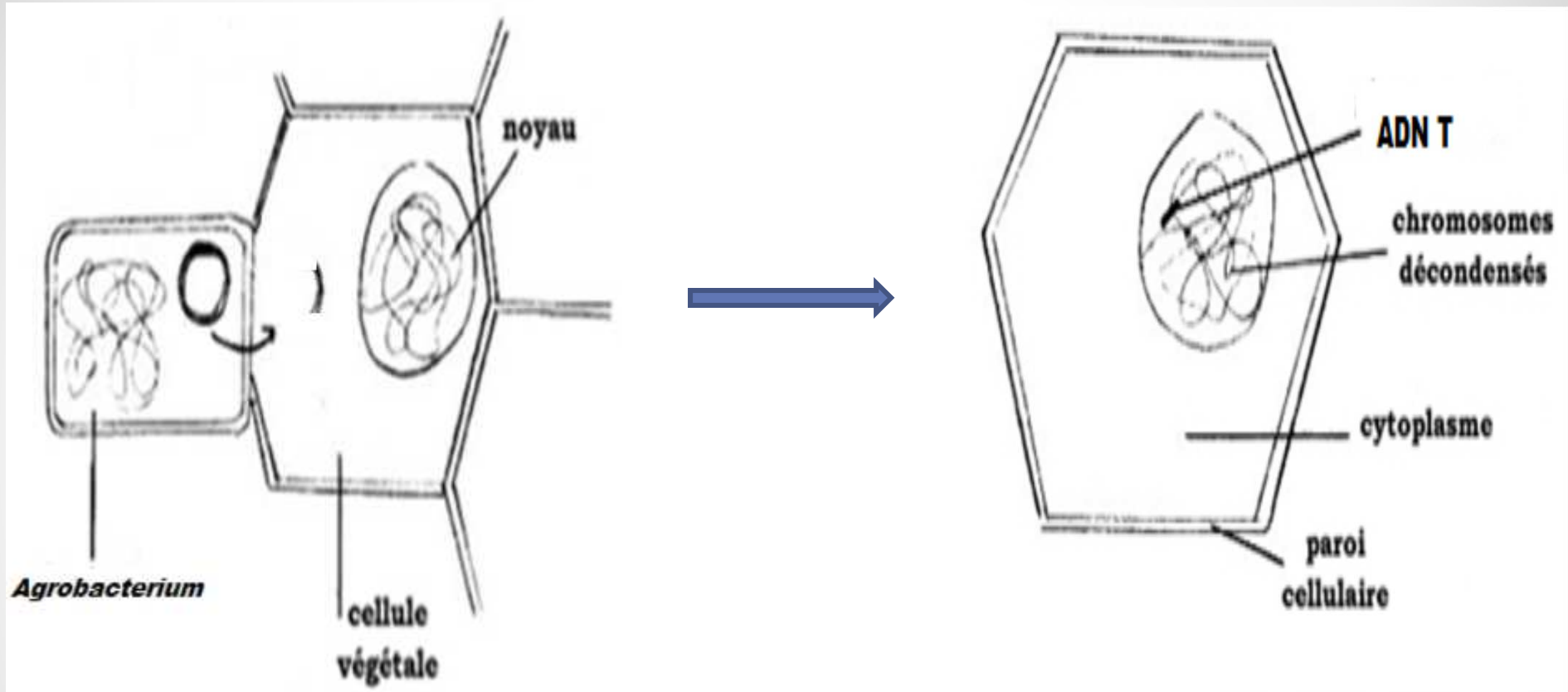
•

•

Après transformation, les bactéries réceptrices sont sélectionnées grâce au gène de sélection bactérien.

Exemple: résistance à une tétracycline.





L'infection d'une culture cellulaire de la plante à transformer permet le transfert de l'ADN-T contenant le gène d'intérêt.

La culture des cellules infectées sur milieu nutritif contenant un agent de sélection permettra la sélection de celles qui ont reçu la construction.

Exemples :

Résistance à la kanamycine (gène *nptII*).

Résistance à l'hygromycine (gène *hpt*),

Ces substances agissent sur les cellules végétales cultivées *in vitro*, et seules les cellules transformées avec le gène conférant la résistance seront susceptibles de se multiplier en leur présence.



Intérêt de l'utilisation d'un gène rapporteur:

Les facteurs environnementaux peuvent modifier l'expression génétique chez les plantes. On parle alors d'interaction plante-environnement.

De ce fait, la réussite de l'introduction du gène d'intérêt à l'intérieur de la plante ne garantit pas sa bonne expression.



Intérêt de l'utilisation d'un gène rapporteur:

Définition:

On appelle gène rapporteur un gène utilisé pour la mise en évidence de l'expression du gène d'intérêt dans les tissus transformés par suivi de son activité.

Exemple:

Le gène *gfp*: *qui code pour la protéine fluorescente verte.*

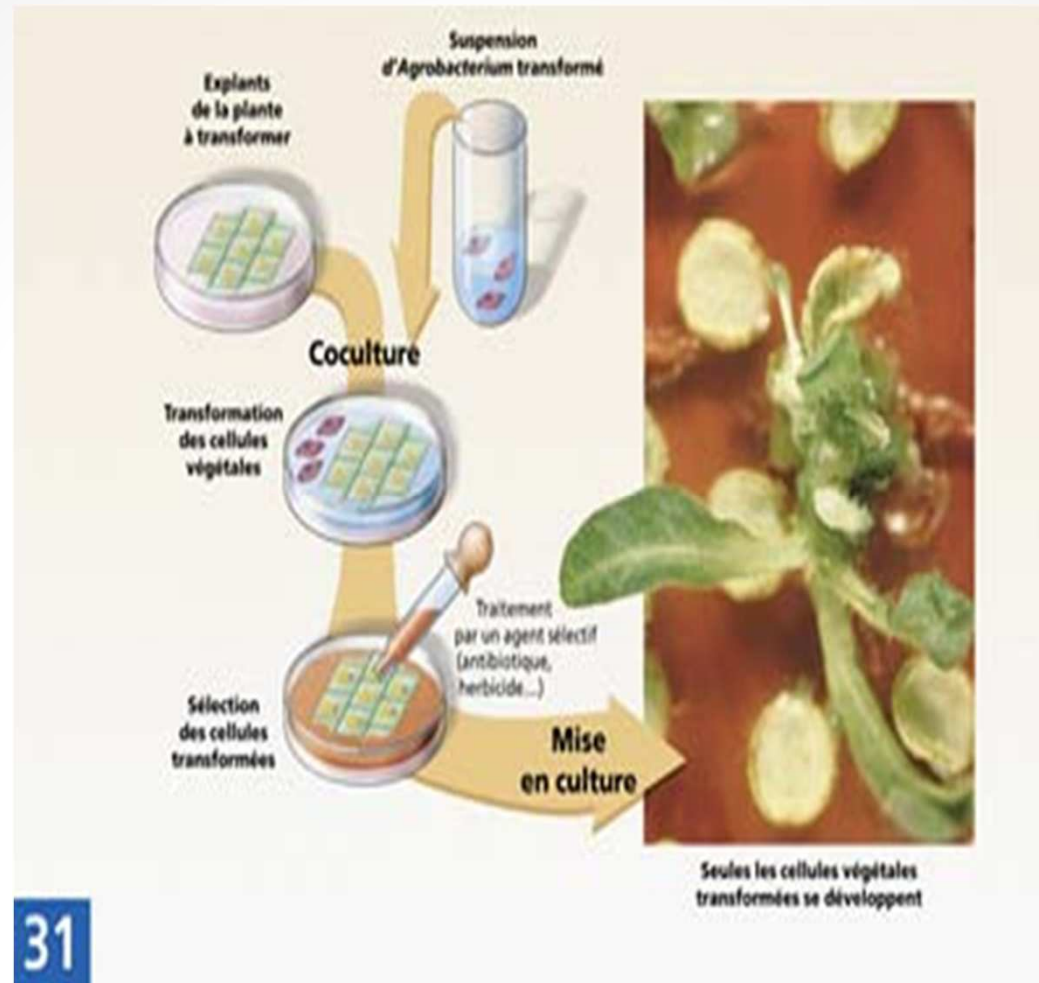
Le gène *luc*: *qui code pour la luciférase.*



Intérêt de l'utilisation d'un gène rapporteur:

Des tests quantitatifs rapides peuvent être utilisés pour mesurer cette expression génétique comme par exemple la mesure du taux de la production d'une protéine fluorescente dont le gène obéit au même promoteur du gène d'intérêt.





L'exploitation de la totipotence de la cellule végétale ainsi que la capacité de diriger la croissance sur milieu artificiel apportée par la culture *In vitro*, permettent la régénération d'une plante entière.

-