

Utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium rhizogenes* comme vecteurs de clonage d'un gène dans la tomate et le tournesol

Chakib ALEM^{1*}, Fatiha EL HAFIANE¹, Bouchaïb EL HAMOURI¹✧
& Moussa ETTALIBI¹

(Reçu le 12/04/1995 ; Accepté le 20/06/1995)

استعمال أكروباكتيريوم تيموفاسيانس وأكروباكتيريوم زيروجيتير كناقل لجينات نباتية في أنسجة الطماطم وعباد الشمس

لقد تم زرع جين P1 من الفطر كلادوسبوريوم فيلوم داخل نبتتين هما الطماطم و عباد الشمس. وذلك باستعمال أكروباكتيريوم تيموفاسيانس و أكروباكتيريوم زيروجيتير كناقل. لقد تم زرع الجين P1 داخل البلاسميد و ، pBIN19. البلاسميد المركب pRK252 تم إدخاله في أشيريشياكولي ED 8767 و من هناك تم نقله إلى الباكتريريا أكروباكتيريوم. وهكذا تم إنجاز نضامين ثنائين أي أن البلاسميد pBINP1 يتواجد مع البلاسميد pRK2013 داخل أكروباكتيريوم تيموفاسيانس كما يتواجد مع البلاسميد داخل أكروباكتيوم ريزوجينين لقد تم اثبات التحويل الجيني في أنسجة الطماطم وعباد الشمس وذلك باستعمال مجس معلّم مكمل لجين P1.

الكلمات المفتاحية : أكروباكتيريوم تيموفاسيانس - أكروباكتيريوم زيروجيبر بلاسميد T1. بلاسميد Ri، نضام مزدوج - تحويل

Utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium rhizogenes* comme vecteurs de clonage d'un gène dans la tomate et le tournesol

L'introduction d'un gène P1 provenant d'un champignon *Cladosporium fulvum*, dans le génome de deux plantes supérieures, la tomate et le tournesol, a été réalisée en utilisant *Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium rhizogenes* comme vecteurs. Le gène P1 a été cloné dans le plasmide pBIN19 dérivé du plasmide pRK252. Le plasmide recombiné pBIN P1 a été d'abord introduit dans une souche d'*Escherichia coli* ED 8767 à partir de laquelle il a été transféré dans *Agrobacterium* par une conjugaison triparentale où le plasmide pBIN P1 a été mobilisé par un plasmide conjugatif pRK 2013. Deux systèmes binaires ont été ainsi obtenus et utilisés dans la transformation génétique des tissus végétaux. La sélection des tissus de tomate et de tournesol transformés a été réalisé grâce à l'association du gène P1 avec un gène conférant la résistance à la kanamycine. La preuve moléculaire de cette transformation des tissus est obtenue par hybridation de leur ADN génomique avec une sonde marquée du gène P1.

Mots clés : *Agrobacterium tumefaciens* - *Agrobacterium rhizogenes* - Plasmide Ti - Plasmide Ri - Système binaire - Transformation

Use of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* as cloning vectors in tomato and sunflower

Genetic transformation of tomato and sunflower tissues by a fungus gene called P1 originating from *Cladosporium fulvum* was attempted using *Agrobacterium tumefaciens* or *Agrobacterium rhizogenes* as vectors. P1 was initially cloned in the plasmid pBIN 19 harboured by *E. coli* ED 8767 leading to pBIN P1 plasmid, introduced either in *A. tumefaciens* or *A. rhizogenes* using a triparental mating approach. The plasmid pBIN P1 was mobilized by the plasmid pRK2013. Two binary systems were thus constructed and used for the transformation of the plant tissues. Transformed tissues from tomato and sunflower were selected on their ability to grow on medium containing kanamycin. The molecular proof of the transformation was obtained by hybridizing genomic DNA from tomato or sunflower tissues with a complementary labeled DNA fragment of P1.

Key words : *Agrobacterium tumefaciens* - *Agrobacterium rhizogenes* - Plasmid Ti - Plasmid Ri - Binary system - Transformation

¹ Département de Biochimie et Biologie Moléculaire, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202 - Instituts, 10101 Rabat, Maroc

* Adresse actuelle : Département de Biologie, Faculté des Sciences et Techniques, Errachidia, Maroc

✧ Auteur correspondant

INTRODUCTION

Agrobacterium, bactérie du sol Gram négatif de la famille des *Rhizobiaceae*, infecte les plantes dicotylédones ou gymnospermes et provoque la prolifération de cellules indifférenciées conduisant à la galle du collet, cas d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan, 1982 & Nester, 1984) ou à la prolifération anarchique de racines, cas d'*Agrobacterium rhizogenes* (White, 1980).

White & Weiller (1982) ont établi que ces transformations ont pour origine le transfert et l'intégration dans le génome des plantes d'une portion d'ADN appelée **ADN-T** provenant du plasmide **Ti** hébergé par *A. tumefaciens* ou du plasmide **Ri** hébergé par *A. rhizogenes*. L'ADN-T porte des gènes codant pour des hormones végétales : AIA et cytokinines (Weiller, 1987) et des gènes codant pour la synthèse de plusieurs types de dérivés d'acides aminés appelés opines qui servent de source de carbone pour les bactéries (Hooykaas, 1984 ; Birot, 1987).

Le transfert de l'ADN-T est contrôlé par deux régions des plasmides **Ti** ou **Ri**. Il s'agit des deux séquences répétées de 25 pb situées aux deux bords de l'ADN-T ainsi qu'une région **vir** codant pour des produits qui mobilisent l'ADN-T et assurent son transfert (Kell, 1982 ; Birot, 1987).

La capacité d'*Agrobacterium* de transférer une partie de son ADN offre la possibilité d'introduire des gènes à caractères agronomiques chez les plantes cultivées (Kingsman, 1988). Ainsi, fut établi un système de cointégrat où l'ADN étranger est cloné sur l'ADN-T d'un plasmide **Ti** ou **Ri** débarrassé de ses oncogènes. Mais vu la grande taille des plasmides **Ti** et **Ri** qui rend leur manipulation délicate, un deuxième système fut créé : le système binaire (Hoekema, 1983 ; Hamill, 1987) où l'ADN étranger est cloné dans un petit plasmide facilement manipulable au niveau d'un mini ADN-T comprenant les 2 séquences de bordure et un gène codant pour un caractère de sélection. Le transfert du mini ADN-T portant le gène étranger est réalisé en trans par la région **vir** d'un plasmide **Ti** ou **Ri** adjacent.

Joosten & De Wit (1988) isolent, à partir du fluide apoplastique de feuilles de tomates attaquées par *Cladosporium fulvum*, une protéine P1 et pensent qu'elle est impliquée dans la détermination de la compatibilité pathogène-hôte. El Hafiane (1989) a isolé le gène correspondant à la protéine P1 à partir d'une banque génomique de *Cladosporium fulvum* confectionnée sur λ gt11 par R. Olivier (University of East Anglia, Norwich, UK).

Dans ce travail, on a tenté d'introduire le gène P1 dans deux plantes supérieures, la tomate et le tournesol, en utilisant *A. tumefaciens* et *A. rhizogenes* comme vecteurs.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Souches bactériennes

Les souches suivantes ont été utilisées :

- *Escherichia coli* ED 8767 qui porte le plasmide pBIN 19 (Hamill, 1987) ;
- *E. coli* HB 101 qui porte le plasmide PRK 2013 (Ditta, 1981) ;
- *E. coli* JM 83 qui porte le plasmide pFC 111 (El Hafiane, 1989).
- *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, souche C58 portant le plasmide pAL4404 à la place du pTi C58 ;
- *A. rhizogenes* LBA 9402 qui porte le plasmide pRi 1855 (Nester, 1984 ; White, 1980).

2. Plasmides

Les plasmides utilisés ont la description suivante:

- pAL 4404 : plasmide pTi Ach 5 ayant subi la délétion de la totalité de son ADN-T (Lichtensteine & Draper, 1985).
- pRi 1855: plasmide Ri de type sauvage portant les régions vir et ADN-T intactes - pBIN 19 ; il provient du plasmide pRK 252 et porte un mini ADN-T qui comprend les deux séquences de bordure d'un ADN-T et un gène **néo** codant pour une néomycine phosphotransférase qui inhibe l'action des antibiotiques de la famille des néomycines comme la kanamycine. Ce dernier est placé sous le contrôle du promoteur du gène NOS qui code pour la synthèse de nopaline. Le mini ADN-T contient en plus un "polylinker" avec des sites de restrictions uniques (Hamill, 1987).
- pRK 2013: construit à partir du plasmide col E1 où ont été clonés les gènes Tra du transfert conjugatif du plasmide pRK 252 (Digitta, 1981).
- pFC 111: plasmide pUC18 où a été cloné un fragment d'ADN appelé "P1" qui provient du génome d'un champignon *Cladosporium fulvum* et qui porte le gène "P1" spécifique aux interactions compatibles *Cladosporium fulvum* - tomate (El Hafiane, 1989).

3. Milieux de culture

Les souches d'*E.coli* et d'*A. tumefaciens* sont cultivées sur un milieu LB. La souche LBA9402 d'*A. rhizogenes* est cultivée sur un milieu YM. Ces milieux peuvent être additionnés d'antibiotiques dans les proportions suivantes : rifamicine (50 mg

par ml), kanamycine (50 mg/ml) et ampicilline (50 mg/ml) (Lichtensteine & Drapper 1985). Les cultures d'*E. coli* sont incubées à 30°C, celle d'*A. tumefaciens* à 28°C et celle d'*A. rhizogenes* à 25°C.

4. Extraction et analyse de l'ADN plasmidial

La procédure suivie dans le cas d'*E. coli* est la lyse alcaline (Maniatis, 1982) alors que pour *Agrobacterium*, on a procédé à la lyse par chauffage selon la méthode décrite par Lichtensteine & Drapper (1985).

L'analyse des ADN plasmidiaux obtenus et des produits de leur digestion par des enzymes de restriction est réalisée par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 0,8% dans un tampon TBE (Maniatis, 1982).

Les enzymes de restriction sont utilisées selon le protocole décrit par la firme SIGMA

5. Clonage du fragment d'ADN "P1" dans le plasmide pBIN 19

Il est réalisé par ligation entre le fragment d'ADN "P1", électroélué à partir du gel d'agarose comme décrit par précédemment, et le vecteur pBIN 19 coupé à l'aide d'Eco RI selon la technique de Hunter (1985).

6. Transformation de la souche ED 8767 par pBINP1

Des souches d'*E. coli* ED 8767 ne portant pas le plasmide pBIN19 et donc sensibles à la kanamycine sont rendus compétentes par un traitement au CaCl₂ froid selon la méthode de Hanahan (1985). Elles ont été transformées par les produits de ligation entre le fragment "P1" et le plasmide pBIN 19. Les souches transformées ont été sélectionnées sur un milieu contenant de la kanamycine.

7. Conjugaison des souches ED 8767 transformées avec des souches d'*Agrobacterium*

Comme le plasmide pBINP1 ne possède pas les gènes Tra du plasmide Rk₂ original, il est incapable de se mobiliser tout seul lors d'une conjugaison (Hamill, 1987). Il nécessite la présence d'un autre plasmide, le pRK2013 qui contient les gènes Tra nécessaires à sa mobilisation. La réalisation de ce transfert conjugal implique l'utilisation de la méthode dite "triparental mating" (Ditta, 1987). Ainsi, la souche ED 8767 contenant le plasmide pBIN P1, la souche HB101 contenant le plasmide pRK 2013 et la souche *Agrobacterium* qui doit recevoir le plasmide sont

mises en culture sur milieux liquides. Ensuite, 20 µl du milieu de culture de la souche ED 8767, 20 ml de HB 101 et 40 ml d'*A. tumefaciens* ou *A. rhizogenes* sont concentrés sur un filtre de 0,45 µm. Le filtre est alors déposé sur une boîte de Pétri contenant le milieu LB et incubé à 30°C pendant 2 jours. Il est ensuite récupéré puis resuspendu dans 1 ml de liquide physiologique. Les souches transconjugantes sont sélectionnées sur un milieu contenant de la kanamycine et de la rifamycine.

8. Matériel végétal

Les graines de tomate et de tournesol sont stérilisées par trempage dans de l'alcool puis dans de l'eau de javel, avant d'être mises à germer. Des fragments de tiges sont prélevés sur ces plantules puis pré-cultivés sur un milieu MSH, c'est à dire milieu MS (Murashige & Skoog, 1962) additionné de BA (benzyladénine) à 1 µg/ml et d'ANA (acide naphthalène acétique) à 0,1 µg/ml (le milieu MS utilisé pour la tomate a une concentration saline diminuée de moitié) pendant 2 jours à 28°C sous une intensité lumineuse de 1750 lux avec une alternance de 16h de lumière avec 8h d'obscurité. À la fin, les fragments retenus sont ceux ayant montré un début d'allongement.

9. Inoculation et transformation des plantes

Les fragments de tiges retenus sont piqués à l'aide d'une aiguille stérile et immergés dans une culture d'*Agrobacterium* pendant 5 à 10 mn. Ils sont retirés et séchés entre deux papiers buvards stériles puis placés dans un milieu MS additionné d'hormones (MSH) pendant 1 à 3 jours.

Les explants sont ensuite rincés avec de l'eau distillée stérile, séchés puis transférés dans un milieu MSH contenant 250 µg/ml d'acide ascorbique, des concentrations appropriées de kanamycine pour sélectionner les cals transformés (100 µg/ml pour la tomate et 300 µg/ml pour le tournesol) ainsi que deux antibiotiques l'ampicilline et la céfotaxime (500 µg/ml) pour éliminer les souches d'*Agrobacterium* des cals transformés.

Après 3 à 4 semaines de culture, il est alors possible de comparer, aux divers témoins, le développement des cals transformés possédant une résistance à la kanamycine.

10. Préparation de l'ADN végétal

Les cellules végétales sont lysées et leur ADN génomique est extrait selon la méthode de Davis *et al.* (1986) puis purifié selon la méthode de Rogers *et al.* (1985).

11. "Southern transfert" et hybridation

Les ADN génomiques provenant des cals transformés et des témoins sont digérés par Hind III. Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose. Ils sont ensuite transférés sur un filtre de nitrocellulose par "Southern transfert" (Mason, 1985). Ce filtre est alors hybridé avec une sonde complémentaire au fragment "P1" et marquée de façon non radioactive selon le protocole fourni par la firme Bohringer Mannheim.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Le gène "P1" étant initialement cloné dans le plasmide pFC III, la succession des opérations adoptées a été comme suit:

- prélèvement du gène "P1" à partir du plasmide pFC III;
- clonage du fragment "P1" dans le plasmide pBIN19: plasmide pBINP1;
- transformation d'une souche d'*E. coli* ED 8767 par le plasmide pBINP1;
- transfert du plasmide pBIN P1 de la souche *E. coli* ED 8767 vers une souche d'*Agrobacterium* par conjugaison;
- inoculation des plantes avec des souches d'*Agrobacterium* contenant le plasmide pBINP1;
- culture et sélection des cals transformés;
- recherche de l'ADN P1 dans l'ADN génomique des cals transformés par hybridation avec une sonde marquée complémentaire au fragment "P1".

%. Clonage du fragment d'ADN P1 dans le plasmide pBIN 19

La coupure du plasmide pFC III par Eco RI (Figure 1 puits 3 et 4) donne 2 bandes: une bande supérieure de 3 Kb correspondant au fragment "P1" d'origine fongique et une deuxième de 26 Kb correspondant au plasmide pUC18.

La bande supérieure représentant le fragment "P1" a été électroéluee puis testée sur gel d'agarose où elle se présente sous forme d'une bande unique (Figure 2 puits 6).

La transformation d'une souche d'*E. coli* ED 8767, sensible à la kanamycine et ne portant aucun plasmide (Figure 2 puits 7), par les produits de ligation du plasmide pBIN 19 coupé à l'aide d'Eco RI avec le fragment "P1" aboutit à la production des souches ED résistantes à la kanamycine dont certaines portent un plasmide qui, une fois coupé par Eco RI (Figure 2 puits 3), donne 2 bandes: une bande supérieure de 10 Kb correspondant au

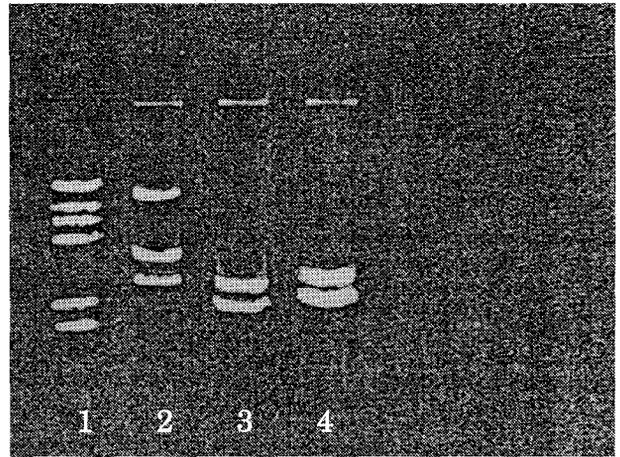


Figure 1. Coupure du plasmide pFCIII par Eco RI

Puits 1 : phage λ coupé par Hind III

Puits 2 : plasmide pFC III non coupé

Puits 3 & 4 : pFC III coupé à l'aide d'Eco RI

plasmide pBIN 19 et une seconde bande de 3 Kb correspondant au fragment "P1"; ce plasmide est appelé plasmide pBINP1.

Les colonies transformées résistantes à la kanamycine peuvent contenir le plasmide pBINP1 ou le plasmide pBIN 19 qui se serait refermé sur lui-même sans insérer le fragment "P1" parmi 8 colonies transformées prises au hasard et analysées (Figure 3).

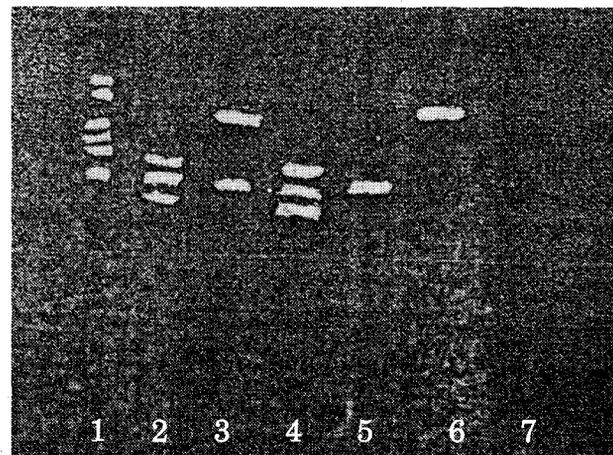


Figure 2. Profils électrophorétiques des différents plasmides utilisés dans la transformation

Puits 1 : phage λ coupé à l'aide de Hind III

Puits 2 : ADN plasmidique non coupé de la souche ED 8767 transformée

Puits 3 : ADN plasmidique de la souche ED transformée coupé par Eco RI

Puits 4 : plasmide pBIN 19 non coupé

Puits 5 : plasmide pBIN19 coupé par Eco RI

Puits 6 : fragment "P1" électroélue

Puits 7 : extraction plasmidique de la souche ED sensible à la kanamycine

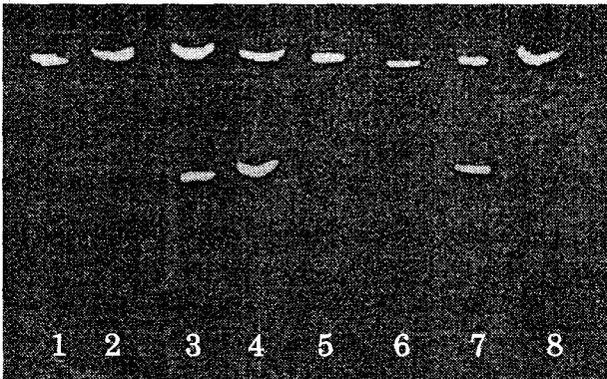


Figure 3. Analyse de l'ADN plasmidial des différentes colonies transformées

Puits 3, 4 et 7 : plasmide pBINP1
Puits 1, 2, 5, 6 et 8 : plasmide pBIN 19

%. Transfert du plasmide pBIN "P1" aux souches d'*A. tumefaciens* et *A. rhizogenes* par conjugaison

Le plasmide pBIN "P1" contenu dans la souche ED 8767 est mobilisé en trans par le plasmide pRK2013 de la souche HB101 pour être transféré à une souche d'*Agrobacterium* par conjugaison comme cela a été décrit dans matériel et méthodes.

%. Analyse de l'ADN plasmidial des souches ayant participé à la conjugaison

L'analyse des profils électrophorétique de l'ADN plasmidial (après coupure par Eco RI) des différentes souches impliquées dans la conjugaison montre que la coupure du plasmide pRK 2013 par Eco RI donne 3 bandes de tailles respectives de 5,6; 3,5 et 3 Kb (Figure 4; puits 3) ; celle du plasmide pBINP1 donne 2 bandes de 10 et 3 Kb (Figure 2, puits 3). Les deux plasmides pAL 4404 et pRi 1855 non coupés se présentent sous forme d'une bande unique de haut poids moléculaire (Figure 5, puits 2 et 4). Leur digestion par Eco RI donne un nombre de fragments d'ADN de petite taille qu'on n'a pas pu séparer et identifier par la méthode électrophorétique adoptée.

La comparaison des profils de l'ADN plasmidial coupé par EcoRI des souches d'*Agrobacterium* avant et après conjugaison montre que les deux souches d'*A. tumefaciens* et *A. rhizogenes* ont acquis 4 bandes d'ADN de 10; 5,6; 3,5 et 3 Kb (Figure 6 puits 1 et 2). Ceci prouve qu'un transfert d'ADN a eu lieu entre les souches d'*E.coli* donatrices et la souche d'*Agrobacterium* réceptrice.

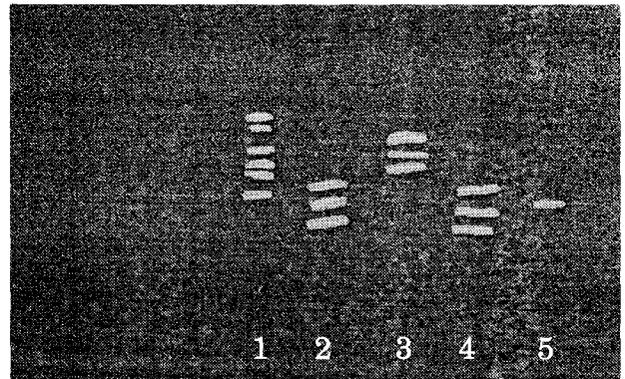


Figure 4. Électrophorèse des plasmides pBIN19 et pRK2013 coupé par Eco RI

Puits 1 : phage λ coupé à l'aide de Hind III
Puits 2 : pRK 2013 non coupé
Puits 3 : pRK2013 coupé à l'aide de Eco RI
Puits 4 : pBIN 19 non coupé
Puits 5 : pBIN 19 coupé à l'aide d'Eco RI

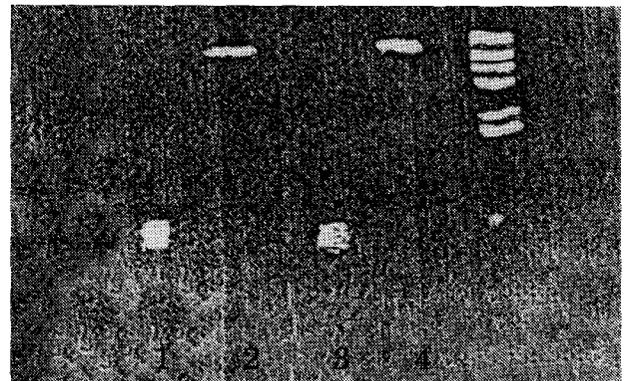


Figure 5. Électrophorèse des plasmides pAL 4404 et pRi 1855 coupé à l'aide d'Eco RI

Puits 1 : pRi 1855 coupé à l'aide d'Eco RI
Puits 2 : pRi 1855 non coupé
Puits 3 : pAL 4404 coupé à l'aide d'Eco RI
Puits 4 : pAL 404 non coupé
Puits 5 : phage λ coupé à l'aide de Hind III

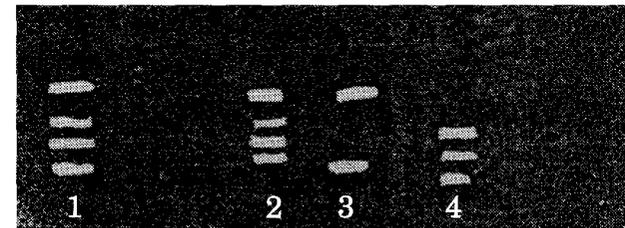


Figure 6. Électrophorèse de l'ADN plasmidial des différentes souches ayant participé à la conjugaison

Puits1 : ADN plasmidial d'une souche transconjugante d' *A.rhizogenes* coupé à l'aide d'Eco RI
Puits2 : ADN plasmidial d'une souche transconjugante d' *A. tumefaciens* coupé à l'aide d'Eco RI
Puits 3 : pBINP1 coupé à l'aide d'Eco RI
Puits 4 : pRK2013 coupé à l'aide d'Eco RI

Les trois bandes de 5,6 ; 3,5 et 3 Kb correspondent, sans doute, au plasmide pRK2013 de la souche d'*E.coli* HB101 coupé par EcoRI alors que la bande de 10Kb correspondrait au plasmide pBINP1 de la souche d'*E.coli* ED 8767 coupé par EcoRI. La deuxième bande de 3 Kb peut se confondre avec celle provenant du plasmide pRK2013 au niveau des profils d'ADN plasmidial des souches d'*A. tumefaciens* ou *A. rhizogenes* transconjugante coupés par EcoRI. Ainsi, la résistance à la kanamycine observée chez les souches d'*Agrobacterium* transconjugantes est due à l'acquisition du plasmide pBINP1 lors de la conjugaison. Selon la méthode utilisée du "triparental mating" (Ditta,1987), il y a trois possibilités de transfert de plasmides au cours de la conjugaison comme le montre le schéma 1.

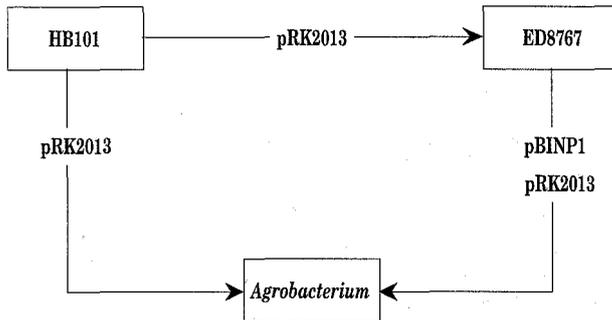


Schéma 1. Transfert de plasmides au cours de la conjugaison chez *Agrobacterium*

Selon ce schéma, on devrait s'attendre à trouver trois sortes de souches d'*Agrobacterium* transconjugantes :

- celles ayant reçu le plasmide pBINP1 seul ;
- celles ayant reçu le plasmide pRK2013 seul ;
- celles ayant reçu les 2 plasmides pBINP1 et pRK 2013.

Pour vérifier cela, on a analysé l'ADN plasmidial de 8 colonies transconjugantes d'*A. tumefaciens* et 8 colonies transconjugantes d'*A. rhizogenes*.

Parmi les huit colonies d'*A. tumefaciens*, deux portent les plasmides pBINP1 et pRK 2013 (Figure 7 puits 4 et 7) alors que six ne portent que le plasmide pBINP1 (Figure 7 puits 1, 2, 3, 5, 6 et 8). De même, parmi les huit colonies d'*A. rhizogenes*, trois sont porteuses des deux plasmides précédents (Figure 8 puits 2, 3 et 6) alors que cinq ne portent que le plasmide pBINP1 (Figure 8 puits 1, 4, 5, 7 et 8).

La première conclusion que l'on peut tirer, bien que notre échantillon ne soit pas très grand, est que le plasmide pRK2013 est transféré avec une efficacité moindre que le pBINP1. De plus, on n'a pas constaté de transfert de plasmide pRK 2013 seul.

Deux hypothèses principales peuvent être avancées pour expliquer cette faible fréquence de transfert du pRK 2013 en comparaison avec le pBINP1 :

- La première reflète probablement la faible étendue du domaine d'hôte du replicon Col E1 dont ce dernier est issu (Ditta,1981), ce qui entraîne une difficulté pour le plasmide pRK 2013 de s'établir chez un organisme relativement distant d'*E. coli* contrairement au plasmide pBINP1 qui est issu d'un replicon RK2 ayant un domaine d'hôte plus étendu (Hamill,1987).
- La faible présence du plasmide pRK 2013 associé au plasmide pBINP1 chez *Agrobacterium* serait due à son sauvetage par recombinaison homologue avec le plasmide pBINP1, cette recombinaison étant favorisée par la région d'homologie entre les deux plasmides (Ditta,1981).

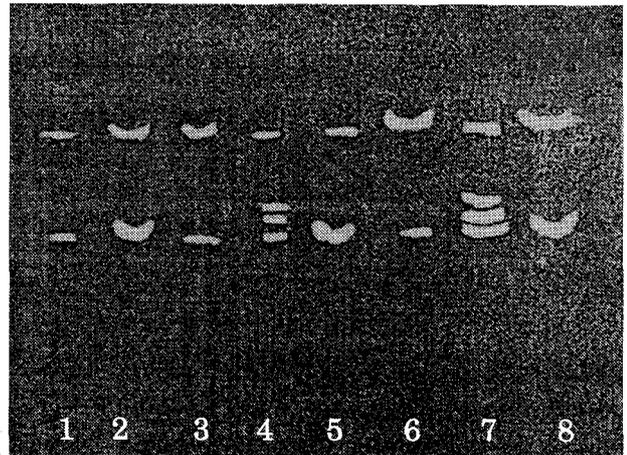


Figure 7. Analyse de l'ADN plasmidial de différentes colonies transconjugantes d'*Agrobacterium tumefaciens* après coupure par EcoRI

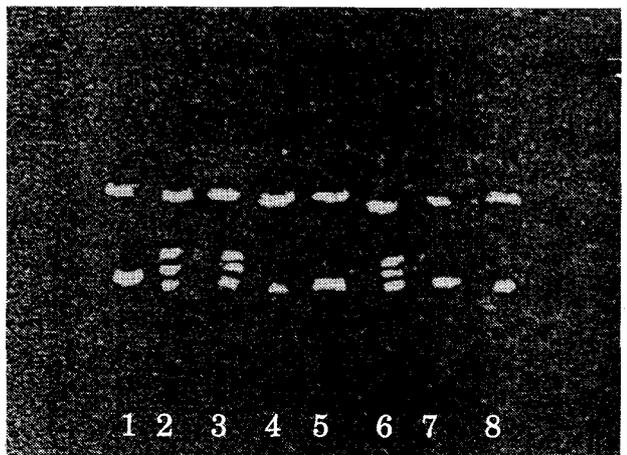


Figure 8. Analyse de l'ADN plasmidial de différentes colonies transconjugantes d'*Agrobacterium rhizogenes* après coupure par EcoRI

Transformation des plantes

Les souches d'*A. tumefaciens* et d'*A. rhizogenes* portant le plasmide pBINP1 ont servi à inoculer des explants de tomate et de tournesol. Cette inoculation entraîne, en principe, le transfert et l'intégration au niveau du génome de la plante infectée de deux gènes: le gène néo codant pour la néomycine phosphotransférase qui confère la résistance à la kanamycine et le gène "P1" qui code pour la protéine "P1" (Schéma 2).

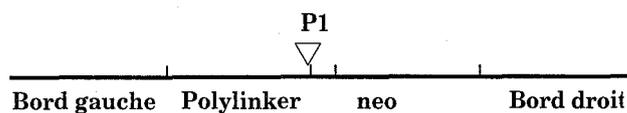


Schéma 2. Emplacement du fragment d'ADN "P1" sur le mini ADN-T

La résistance à la kanamycine conférée par le gène *neo* servira de critère de sélection des cals transformés.

Transformation de la tomate et du tournesol par *A. tumefaciens*

Les explants de tomate ou de tournesol inoculés avec une souche d'*A. tumefaciens* portant le seul plasmide pAL 4404 sont incapables de se développer sur un milieu contenant la kanamycine et finissent par se nécroser (Figures 9 THK & 10 THK) alors que les explants inoculés avec une souche d'*A. tumefaciens*, qui porte en plus son

plasmide pAL 4404, le plasmide pBINP1, se développent sur ce même milieu et forment des cals (Figures 9 TkpHK & 10 TkpHK)

Ainsi, l'acquisition de la résistance à la kanamycine par le tissu végétal inoculé est à mettre en relation avec la présence du plasmide pBINP1 dans la souche d'*A. tumefaciens* qui a servi à l'inoculation. Cette résistance persiste même après l'élimination de la souche d'*A. tumefaciens* par un traitement aux antibiotiques. Ceci ne peut s'expliquer que par un transfert et une expression du gène néo qui inhibe les effets de la kanamycine en la phosphorylant. Lors de l'infection des explants de tomate et de tournesol par une souche d'*A. tumefaciens* portant les plasmides pAL4404 et pBINP1 associés en système binaire, le génome végétal est susceptible d'intégrer la totalité ou une partie du mini ADN-T portant le fragment "P1". De plus, comme le plasmide pAL4404 ne porte pas d'ADN-T (les fragments de tiges inoculés sont incapables de se développer dans un milieu dépourvu d'hormones de croissance (Figures 9 To et 10 To), le mini ADN-T du plasmide PBIN "P1" serait le seul ADN transféré et intégré dans le génome végétal.

Le développement des explants de tomate et de tournesol inoculés avec une souche d'*A. rhizogenes* portant le seul plasmide pRi 1855 est inhibé par la kanamycine (Figures 11 RHK et 12 RHK). Cependant, les explants inoculés avec une souche

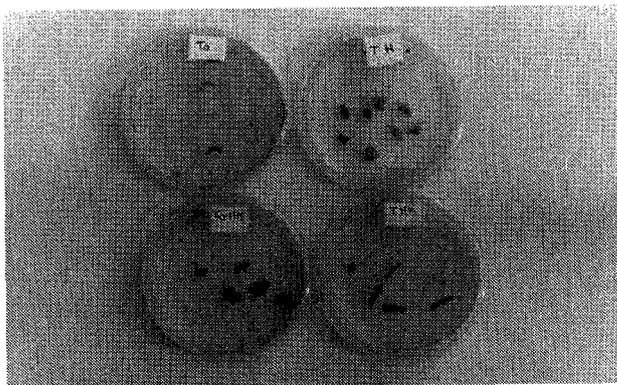


Figure 9. Transfert à la tomate de la résistance à la kanamycine par l'utilisation d'*A. tumefaciens* LBA4404

- To explants inoculés par une souche d' *A. tumefaciens* portant le seul plasmide pAL 4404 et placé sur un milieu MS dépourvu d'hormones de croissance
- TH explants inoculés par une souche d' *A. tumefaciens* portant le seul plasmide pAL 4404 et placés dans un milieu MSH contenant les hormones de croissance
- THK explants inoculés par une souche d' *A. tumefaciens* portant le seul plasmide pAL 4404 et pBINP1 et placés dans un milieu MSH contenant de la kanamycine
- T_{kp}HK explants inoculés par une souche d' *A. tumefaciens* portant les deux plasmides pAL4404 et pBINP1 et placés dans un milieu MSH contenant de la kanamycine

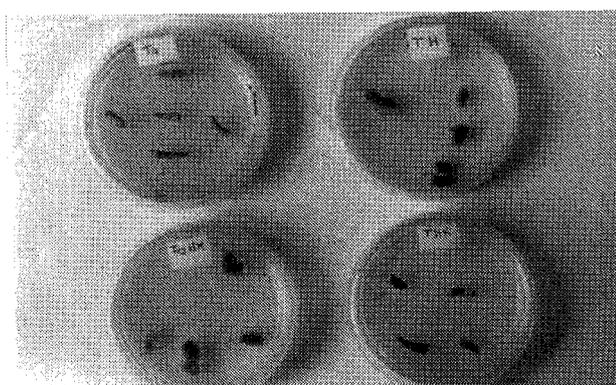


Figure 10. Transfert au tournesol de la résistance à la kanamycine par l'utilisation d'*A. tumefaciens* LBA 4404

d'*A. rhizogenes*, qui porte, en plus de son plasmide pRi 1855, un plasmide pBINP1, se développent dans le même milieu sous forme de cals avec plusieurs ébauches racinaires (Figure 11 R_{kp}HK et Figure 12 R_{kp}HK).

La persistance de cette résistance, après l'élimination de la souche infectante, ne peut s'expliquer que par un transfert et une expression du gène codant pour la néomycine phosphotransférase porté par le mini ADN-T.

Cependant, l'infection de ces explants par une souche d'*A. rhizogenes* portant le seul plasmide pRi 1855 induit un développement remarquable de racines quand ils sont placés dans un milieu MS dépourvu d'hormone (Figure 11 RO et Figure 12 RO); ceci indique un transfert et une intégration de l'ADN-T du plasmide pRi 1855 au niveau du génome végétal. Ainsi, l'utilisation du plasmide pBINP1 en association avec le plasmide pRi 1855 en système binaire entraîne, en plus du transfert du mini ADN-T du plasmide pBINP1, le transfert de l'ADN-T du plasmide pRi 1855.

∕ Analyse de l'ADN génomique des explants transformés

Bien qu'il n'ait jamais été observé de mutations conférant à la plante une résistance à la kanamycine, le moyen le plus sûr pour confirmer que l'acquisition de cette résistance est bien due à un transfert d'ADN entre la souche d'*Agrobacterium* infectante et la plante est d'analyser l'ADN génomique des différents cals pour mettre en évidence la présence de l'ADN introduit.

La présence du mini ADN-T au niveau des génomes des cals transformés pourrait être mise en évidence par hybridation avec une sonde marquée qui soit complémentaire au gène néo ou au fragment "P1".

On a choisi l'utilisation d'une sonde complémentaire au fragment "P1" car celui-ci est facilement accessible à partir du plasmide pFCIII par une seule coupure par EcoRI. De plus, sa position sur le mini ADN-T par rapport au bord droit à partir duquel débute le transfert (Jeng, 1986) fait que si on prouve que le fragment "P1" a été transféré et intégré dans le génome végétal, on prouvera, du même coup, le transfert et l'intégration dans ce même génome de toute la portion du mini ADN-T située entre le fragment "P1" et la séquence de bordure droite, portion portant le gène néo.

∕ Hybridation de l'ADN génomique végétal avec une sonde complémentaire au fragment "P1"

La sonde marquée complémentaire au fragment "P1" est hybridée avec l'ADN génomique des cals de tomate et de tournesol suivants (Figure 13):

- Cals non transformés (puits 1 et 10).
- Cals transformés par des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* ou *rhizogenes* portant le plasmide pBIN 19 (puits 2,3,8 et 9).
- Cals transformés par des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* ou *rhizogenes* portant le plasmide pBINP1 (puits 4,5, 6 et 7).

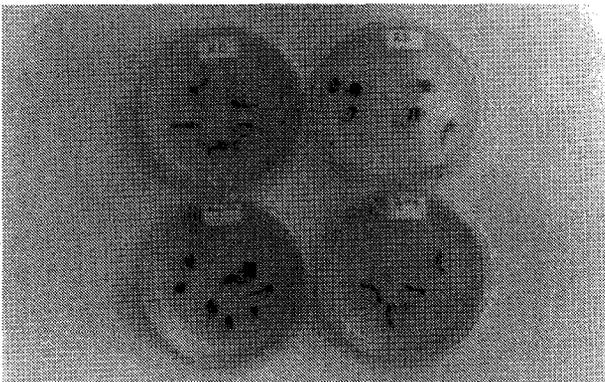


Figure 11. Transfert à la tomate de la résistance à la kanamycine par l'utilisation d'*Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402

RO : explants inoculés avec une souche d' *A. rhizogenes* portant le seul plasmide pRi 1855 et placés dans un milieu MS dépourvu d'hormones de croissance
 RH : explants inoculés avec une souche d' *A. rhizogenes* portant le seul plasmide pRi 1855 et placés dans un milieu MSH pourvu en hormones de croissance
 RHK : explants inoculés avec une souche d' *A. rhizogenes* portant le seul plasmide pRi 1855 et placés dans un milieu MSH contenant de la kanamycine
 R_{kp}HK : explants inoculés avec une souche d' *A. rhizogenes* portant les plasmides pRi 1855 et pBINP1 et placés dans un milieu MSH contenant la kanamycine

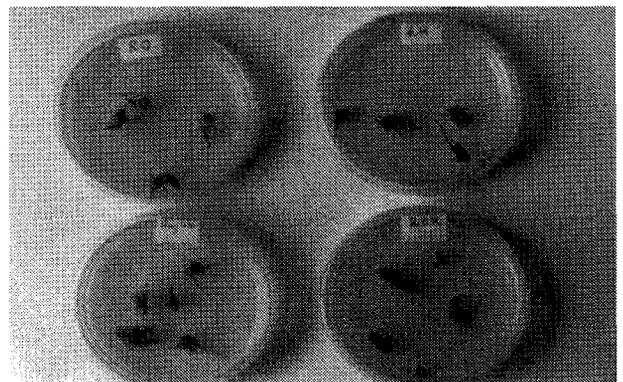


Figure 12. Transfert au tournesol de la résistance à la kanamycine par l'utilisation d'*Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402

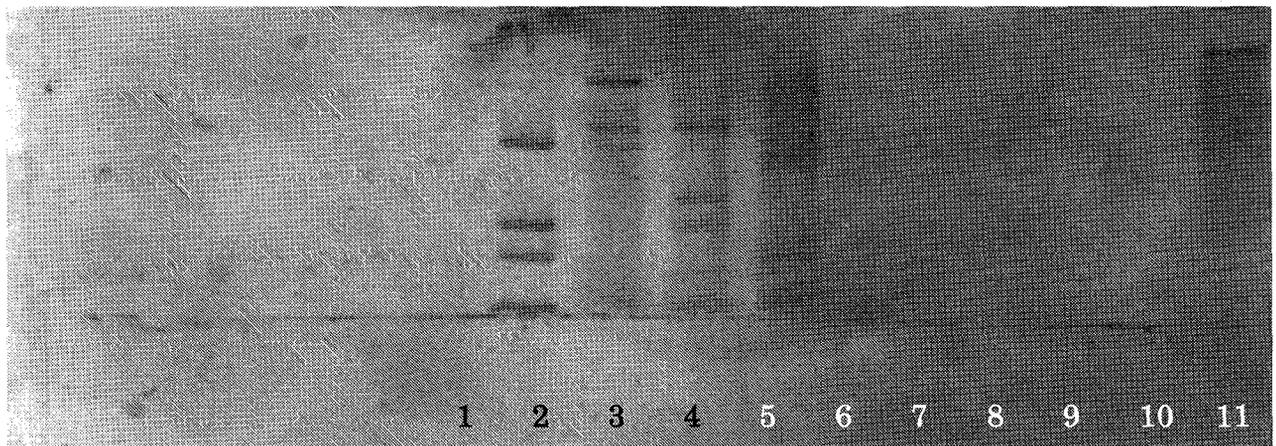


Figure 13. "Southern blot" de l'ADN génomique végétal par une sonde complémentaire au fragment P1

- Puits 1: ADN génomique d'un cal témoin de tournesol
 Puits 2: ADN génomique d'un cal de tournesol transformé par une souche d' *A. tumefaciens* contenant le plasmide pBIN 19
 Puits 3: ADN génomique d'un cal de tournesol transformé par une souche d' *A. rhizogenes* contenant le plasmide pBIN 19
 Puits 4: ADN génomique d'un cal de tournesol transformé par une souche d' *A. tumefaciens* contenant le plasmide pBINP1
 Puits 5: ADN génomique d'un cal de tournesol transformé par une souche d' *A. rhizogenes* contenant le plasmide pBINP1
 Puits 6: ADN génomique d'un cal de tomate transformé par une souche d' *A. rhizogènes* contenant le plasmide pBINP1
 Puits 7: ADN génomique d'un cal de tomate transformé par une souche d' *A. tumefaciens* contenant le plasmide pBINP1.
 Puits 8: ADN génomique d'un cal de tomate transformé par une souche d' *A. rhizogènes* contenant le plasmide pBIN 19
 Puits 9: ADN génomique d'un cal de tomate transformé par une souche d' *A. tumefaciens* contenant le plasmide pBIN 19
 Puits 10: ADN génomique d'un cal témoin de tomate
 Puits 11: ADN du fragment "P1" ayant servi comme matrice pour la synthèse de la sonde d'ADN marquée

N.B: Pour que la bande correspondant au fragment "P1" ne soit pas trop éloignée des fragments du profil d'ADN génomique coupé, vu leur trop grande différence de taille, l'ADN du fragment "P1" n'a été ajouté qu'après que l'ADN génomique ait déjà migré et de ce fait la bande du puits 11 ne constitue en aucun cas une référence pour la taille

Les seules hybridations obtenues (Figure 13) sont spécifiques aux ADN génomiques des cal de tomate ou de tournesol qui ont été inoculées par des souches d'*Agrobacterium* qui portaient le plasmide pBINP1 (Figure 13 ; puits 4, 5, 6 et 7). Ceci met en évidence la capacité des souches LBA 4404 d'*A. tumefaciens* et LBA 9402 d'*A. rhizogenes* de promouvoir le transfert du mini ADN-T contenant le fragment "P1" et le gène néo par le fonctionnement des systèmes binaires formés par les associations pAL4404, pBINP1 ou bien pRi 1855, pBINP1.

CONCLUSION

L'utilisation d'un système binaire composé par l'association du plasmide pBIN19 avec le plasmide pAL4404, chez la souche d'*A. tumefaciens* LBA4404, ou bien avec le plasmide pRi 1855, chez la souche d'*A. rhizogenes* LBA 9402 nous a permis de transférer un gène d'origine fongique dans deux plantes supérieures, la tomate et le tournesol.

Ce système semble permettre le transfert de n'importe quel morceau d'ADN de taille convenable qui peut porter un gène que l'on pense être intéressant pour la plante.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient :

- la Fondation Internationale pour la Science (FIS) qui a financé une partie de ce travail ;
- le British Council Rabat qui a permis à B.ت. El.ت. Hamouri de séjourner dans le laboratoire du Dr R. Oliver (University of East Anglia, Norwich, UK) afin d'initier ce travail ;
- Dr Cathie Martin du Département de Génétique de l'Institut Joha INNES Norwich (U.K.) qui a mis à leur disposition les souches *A. tumefaciens* et *A. rhizogenes* utilisées dans ce travail ;
- le Professeur Walali-Loudiyi (IAV Hassan II) qui a mis à leur disposition la salle de culture *in vitro* et qui a bien voulu discuter avec eux le manuscrit ;
- Dr N. Assali (IAV Hassan II) qui a mis à leur

disposition un kit non radioactif pour la révélation du Southern blot ainsi que pour les suggestions qu'il leur a faites lors de la réalisation de certaines manipulations.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Bevan M.W. & Chilton M.D. (1982) TDNA of the *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids *Ann. Rev. Genet.* 16 : 357-384
- Birot A.M., Bouchez D., Casse-Delbart F., Durand-Tarif M., Jouanin L., Pautot V., Robaglia C., Tepper D., Tepper M., Tourneurs J. & Vilain F. (1987) Studies and uses of the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant. Physiol.* 25 (3) :323-335
- Chilton M.D., Saiki R.K., Yadav N., Gordon M.P. & Quetier F. (1980) TDNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77 (7) : 4060-4064
- Davis L.G., Dibner M.D. & Battey J.F. (1986) Basic in Molecular Biology. Elsevier
- Ditta G., Stanfield S., Corbin D. & Helinski D. (1981) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria : construction of a gene bank of *rhizobium meliloti*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 7347-7351
- EL Hafiane F. (1989). Isolement et caractérisation partielle d'un gène codant pour une protéine associée à la compatibilité entre *Cladosporium fulvum* et la tomate. Mémoire de 3ème cycle Agronomie, IAV Hassan II, Rabat
- Hamill J.D., Prescott A. & Martin C. (1987) Assesment T-DNA of disarmed binary vectors derived from *Agrobacterium tumefaciens* and the T-DNA of *A.rhizogenes*. *Plant. Molec. Biol.*
- Hanahan D. (1985) Techniques for transformation of *E.coli* in Glover D. M. (ED), DNA cloning, volume II, a practical approach. IRL Press, Oxford, Washington D.C.
- Hoekema A., Hirsch P.R., Hooykaas P.J.J. & Schilperoort R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of the vir and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids. *Nature* 303 : 197-180
- Hooykaas P.J.J. & Schilperoort R.A. (1984) The molecular genetic of crown gall tumourigenesis. *Adv. Genet* 22: 210-283
- Hunter I.S. (1985) Gene cloning in streptomycetes in Glover D.M. DNA cloning, volume II, a practical approach. IRL press, Oxford, Washington D.C.
- Jen.G.C. & Chilton M.D. (1986) The right border region of p Ti T 37 TDNA is intrinsically more active than the left border region in promoting TDNA transformation *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 83 : 3895-3899
- Joosten M.H.A.J. & De Wit P.J.G.M. (1988) Isolation, purification and preliminary characterisation of a protein specific for *Cladosporium fulvum* tomatoe interactions. *Phys. Mol. Plant Path.* 24:240-252
- Kell H.J., Gordon M.P. & Nester E.W. (1982) Complementation analysis of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid mutations affecting oncogenicity. *J. Bacteriol.* 150 : 327-331
- Kingsman S.M. & Kingsman A.J. (1988) Genetic engineering .An introduction to gene analysis and exploitation in eukaryotes. *Black. Sci. Pub.* 207-208
- Lichtenstein C. & Draper J. (1985). Genetic engineering of plants in Glover D.M. (Ed), DNA cloning volume II, a practical approach. IRL Press, Oxford, Washington D.C.
- Maniatis T., Fritsch E.F. & Sanbrook J. (1982). Molecular cloning a laboratory manuel cold spring harbor laboratory, New York
- Mason P.J. & Williams J.G. (1985) Hybridisation in the Analysis of recombinant DNA in Hames B.D. & Higginss (Ed) Nucleic acid hybridisation a practical approach IRL press, Oxford, Washington D.C.
- Murashige T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol.Plant.* 15: 473-497
- Nester E.W., Gordon N.P., Amasino R.M. & Yanofsky M.F. (1984) Crown gall: a Molecular and physiological analysis. *Ann. Rev. Physiol.* 35 : 387-413
- Rogers S.O. & A.J. Bendich (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5 : 69-76
- Weille E.W. & Schroder J. (1987) Hormone genes and crown gall disease *TIBS* (12) : 271-275
- White F.F., Ghidossi G., Gordon M.P. & Nester E.W. (1982) Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the tranfer of plasmid DNA to the plant genome. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 3193-3197
- White F.F. & E.W. Nester (1980) Hairy root : plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriol.* 141: 1134-1141