

AGROBACTERIUM

Genre de bactéries phytopathogènes du sol, à Gram négatif, aérobies, hétérotrophes, mobiles par flagelles. Certaines espèces, du type *tumefaciens* ou *rhizogenes* par exemple, possèdent la particularité d'infester (démontrée en 1977) une large gamme de plantes (plus de 600 espèces connues) Dicotylédones herbacées ou ligneuses ainsi que quelques rares Monocotylédones (maïs, riz, canne à sucre).

L'infection de ces plantes se traduit par des réactions tumorales ou des déformations au niveau du site d'infection (cas d'*Agrobacterium tumefaciens*) ou par le développement anarchique du système racinaire (cas d'*A. rhizogenes*), résultant de l'expression de gènes bactériens qui sont, lors du processus d'infection, dupliqués, transférés de la bactérie vers la plante puis intégrés de façon stable dans les chromosomes des cellules végétales infectées. Cette observation a constitué la base d'une des techniques les plus utilisées actuellement en génie génétique végétal. Ainsi, dès le début des années 80, le protocole de transformation génétique des cellules, basé sur l'utilisation de l'ADN d'*A. tumefaciens*, est mis au point, faisant de cette bactérie un extraordinaire outil de génie génétique.

Dans la bactérie, les oncogènes (gènes *onc*) ou gènes tumoraux sont portés par une molécule d'ADN circulaire, d'environ 200-800 kb, appelée plasmide (Ti pour *Tumor inducing* dans le cas d'*A. tumefaciens*, Ri pour *Root inducing* dans le cas d'*A. rhizogenes*) ; le transfert est assuré par les séquences d'ADN adjacentes aux gènes qui induisent la tumeur.

Dans la nature, *Agrobacterium* est attiré par des petits composés phénoliques, comme l'acétosyringone ou l'hydroxyacétosyringone ainsi que des acides aminés et des sucres qui sont libérés par les plantes qui présentent des lésions mineures. Ces substances chimiques induisent le déplacement des bactéries et leur fixation à la plante par l'intermédiaire de divers types de récepteurs à la surface cellulaire. Les mêmes inducteurs activent l'expression des gènes de virulence (gènes *vir*) sur le plasmide Ti ou sur le plasmide Ri qui sont responsables du transfert et de l'insertion l'ADN (appelé ADN-T, pour ADN transféré) dans le génome des cellules végétales hôtes. Une fois intégrés au génome de la plante, les gènes de l'ADN-T sont exprimés. Ces gènes codent pour des enzymes qui synthétisent deux hormones végétales, les auxines et les cytokinines. Les premières favorisent la croissance des cellules végétales ; les secondes induisent leur division. Les cellules de la plante infectée commencent à croître anarchiquement, entraînant une tumeur, généralement au niveau du collet (galle du collet) ou un chevelu racinaire, selon les cas.

L'ADN-T porte également des gènes permettant la synthèse et la libération des opines, qui résultent de la condensation de différents acides aminés et de dérivés de sucres phosphatés. Le type d'opine différencie les diverses souches d'*Agrobacterium*. Les opines sont fabriquées par des cellules végétales qui contiennent de l'ADN-T, mais sont utilisées par les bactéries qui les ont infectés comme source de carbone, d'azote et d'énergie. Les autres bactéries, qui pourraient se trouver dans le même milieu, ne sont pas capables d'utiliser ces opines parce qu'elles ne possèdent pas les gènes pour leur absorption et leur métabolisme. La production des opines confère ainsi aux bactéries ayant le plasmide Ti un important avantage sélectif sur les autres micro-organismes du milieu.

Il est possible actuellement de remplacer les gènes *onc* bactériens par d'autres gènes que l'on souhaite introduire dans le végétal ; les séquences adjacentes (constituées de 25 paires de bases) insèrent alors les gènes étrangers (ou transgènes) dans les chromosomes de la plante aussi fidèlement que s'il s'agissait des gènes tumoraux, tout en empêchant la croissance incontrôlée de la cellule infectée. Ainsi, à partir de protoplastes ou de cellules végétales transfectées artificiellement, on peut régénérer des plantes transgéniques saines. Cette stratégie de transformation a été appliquée avec succès à plus d'une centaine d'espèces d'importances économiques appartenant aux

Dicotylédones dont le colza, la tomate, le coton, la courgette, la pomme de terre, le soja, le tabac, la betterave ...

La majorité des Légumineuses à grosses graines ainsi que la plupart des Monocotylédones, auxquelles appartiennent beaucoup de Céréales (blé, orge, avoine, sorgho, mil, etc.) sont généralement récalcitrantes à la transformation par *Agrobacterium* ; on fait plutôt appel au transfert direct (ex. biolistique) ou à d'autres techniques pour ces espèces.

Lorsque de telles opérations sont réalisées sur la plante entière, quelques zones cellulaires seulement sont touchées par la transformation ; il faut alors les identifier et les régénérer. Il est plus aisé, à l'aide de cette technique, de transformer des cellules isolées ou, mieux encore, des protoplastes qui donneront par régénération des plantes totalement modifiées.

Les cellules végétales qui ont intégré le nouveau gène le transmettent à leur descendance lors de la division. Les plantes régénérées à partir de ces cellules isolées contiennent ainsi au moins un exemplaire du gène introduit par cellule. À l'exception du gène transféré, ou « transgène », ces plantes sont normales et produisent des graines qui contiennent également le transgène.

Habituellement, on utilise des tissus ou des organes spéciaux pour la transformation : cals de tissus (ex. maïs), fragments de tissus (ex. feuilles de pommes de terre ou de tabac), ou des embryons immatures isolés (ex. blé) et organes simples (ex. bourgeons de colza). Par ailleurs, un protocole de transformation *in planta* (utilisant des plantes entières) a été développé pour la plante modèle *Arabidopsis thaliana* mais a été étendu à d'autres plantes, comme la plante modèle *Medicago truncatula*, certaines espèces du genre *Brassica* mais aussi le blé, le maïs, le riz et le coton. Une méthode efficace consiste à plonger ou infiltrer les bourgeons floraux de la plante avec une suspension d'*Agrobacterium* en présence d'un tensioactif. Les cellules de la lignée germinale sont alors transformées avec une haute fréquence avant la méiose et donc transfèrent l'ADN-T intégré directement aux graines de la génération suivante. Afin d'optimiser la transformation, certains auteurs suggèrent de répéter l'infiltration plusieurs fois. Actuellement, c'est la méthode la plus rapide et la moins coûteuse de transformation de nombreuses espèces végétales. Son autre avantage est d'éliminer les mutations somatiques et les changements épigénétiques (méthylation de l'ADN) observés habituellement dans les cellulaires sur des milieux synthétiques.

Parmi les transformations réalisées avec succès au moyen d'*Agrobacterium*, on peut citer : la tolérance au glyphosate, à la salinité et à la sécheresse et l'amélioration de la qualité (accumulation de caroténoïdes) chez le riz ; l'amélioration de la tolérance à la salinité et à la sécheresse chez le maïs ; la résistance à des herbicides, à des insectes nuisibles et à des stress abiotiques (salinité, sécheresse) chez la moutarde et la pomme de terre ; la tolérance à différents stress biotiques (insectes, nématodes, champignons nuisibles, etc.) chez le coton ; l'amélioration de la qualité de l'huile chez le soja ; l'amélioration de la qualité de la tomate.

À partir de racines transformées, on peut induire des cultures de chevelus racinaires qui présentent souvent une capacité de biosynthèse de métabolites secondaires égale ou supérieure à celle des plantes mères. Certains composés bioactifs qui s'accumulent habituellement uniquement dans la partie aérienne de la plante sont ainsi synthétisés en quantité abondante dans les cultures de chevelus racinaires. C'est le cas, par exemple, de la lawsonone produite dans les cultures de chevelus racinaires de *Lawsonia inermis* à l'obscurité et de l'artimisine produite par *Artemisia annua*. En outre, les cultures de chevelus racinaires produisent parfois de nouveaux composés comme la licoagro-dione douée d'activité antimicrobienne et qui a été isolée à partir des cultures de chevelus racinaires de *Glycyrrhiza glabra*.