

50376
1995
145

N° d'ordre

**THESE de DOCTORAT de l'UNIVERSITE des SCIENCES et
TECHNOLOGIES de LILLE**

Option: PHYSIOLOGIE ET GENETIQUE MOLECULAIRE VEGETALE

présentée par

Malika ABID



pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université en Sciences de la Vie et de la Santé

**Transformation de *Cichorium intybus* L.
Etude de l'expression du gène *uidA* dans les plantes
transgéniques**

Soutenue le 19 Avril 1995 devant la commission d'examen :

S. Rambour
B. Sangwan
A. Reynaerts
R. Jean
M. Boulay

Professeur, Université de Lille I
Professeur, Université d'Amiens
Docteur es Sciences PGS, Gand
Professeur, Université de Lille I
Docteur es Sciences LVMH Recherche Nanterre

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Remerciements

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur S. Rambour, Président de ce jury, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour les conseils qu'il m'a prodigués au cours de ce travail et lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie vivement Madame le Professeur B. Sangwan (Université d'Amiens) ainsi que Madame A. REYNAERTS, Docteur es Science (Plant Genetic System) d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Qu'elles trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie Messieurs M. BOULAY, Responsable du Département Végétal à LVMH Recherche Nanterre, et R. JEAN, Professeur à l'Université de Lille I d'être des examinateurs de cette thèse.

J'exprime ma profonde gratitude à Mademoiselle B. HUSS pour l'intérêt constant qu'elle a manifesté pour l'élaboration de ce manuscrit, pour ses discussions fructueuses, ses conseils et sa disponibilité.

Je suis redevable à Monsieur B. LEGRAND pour la réalisation d'une partie des photos de ce manuscrit. A ces remerciements, je voudrais associer Benoît, Pascale, Christophe, Eric, Robert, Nathalie pour leur aide, leurs conseils et pour toutes nos nombreuses discussions animées.

Que toutes les personnes du labo (chercheurs, étudiants, stagiaires, personnel technique) soient remerciées pour leur bonne humeur qui m'a permis d'effectuer cette thèse dans d'excellentes conditions.

Enfin un grand merci à ma famille et tout particulièrement à mes parents pour leur aide, confiance et encouragements, et auxquels je dois beaucoup.

Introduction	1
 Revue bibliographique	
1. Transfert direct de l'ADN	4
2. Transfert indirect de l'ADN	7
2-1 Transformation par voie virale.....	7
2-2 Transformation par voie bactérienne.....	8
2-3 La galle du collet.....	8
2-4 Structure et fonction du plasmide Ti	9
2-5 Fonctions des gènes de l'ADN-T.....	9
2-6 Système analogue	
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	11
2-7 Mécanisme moléculaire du transfert de l'ADN-T.....	12
2-8 Vecteur de transformation basé sur le plasmide Ti	15
2-8-1 Système de cointégration.....	16
2-8-2 Système binaire.....	17
2-9 Intégration de l'ADN-T.....	17
3. Contrôle de l'expression d'un gène	19
3-1 Régulation des gènes.....	20
3-1-1 Gènes inductibles	20
3-1-2 Expression des gènes spécifiques des tissus.....	21
4. Facteurs influençant l'expression des gènes.....	22
5. Conclusion	23
 Matériels et Méthodes	
1. Le matériel végétal.....	25
2. Aseptisation	25
3. Mise en culture	25
3-1 des explants racinaires	25
3-2 des explants foliaires.....	25
3-3 des explants cotylédonaire	26
4. Enracinement des bourgeons.....	26
5. Test de sensibilité à la kanamycine	26
6. Les souches d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
7. Préparation des bactéries	27
8. Infection des explants	28
8-1 Les explants racinaires.....	28

8-2 Les explants foliaires et cotylédonaire	29
9. Adhésion bactérienne	29
10. Détection de la vitronectine dans les tissus de la chicorée	30
11. Analyse histochimique	31
11-1 Test GUS	31
11-2 Confection des coupes	32
12. Analyse biochimique	32
13. Analyse moléculaire des plantes transgéniques	33
13-1 Préparation de l'ADN génomique des plantes et transfert par southern sur une membrane de nylon	33
13-2 Préparation d'ADN plasmidique et marquage des sondes	34
14. Marquage et purification des sondes	35
15. Hybridation	35
16. Analyse de la génération F1	36
17. Transformation des protoplastes par électroporation	37
17-1 Le matériel végétal	37
17-2 Détermination des paramètres de survie des protoplastes	38
17-3 Survie des protoplastes après traitement électrique	39
17-4 Concentrations du plasmide et de l'ADN entraîneur utilisées	39
17-5 Test GUS	39

Résultats

I. Aptitude de différents organes de la chicorée de Bruxelles à la culture

<i>in vitro</i>	40
1. Mise en culture d'explants racinaires	40
1-1 Composition du milieu de culture	40
1-2 Zone de prélèvement d'explants	40
2. Mise en culture d'explants foliaires	41
2-1 Matériel de départ utilisé	41
2-2 Composition du milieu de culture	41
3. Mise en culture d'explants cotylédonaire étiolés	42
4. Conclusion	42
5. Enracinement des bourgeons	44
6. Conclusion	45
7. Test de sensibilité à la kanamycine	45
7-1 Explants racinaires	46
7-2 Explants foliaires	47
7-3 Explants cotylédonaire	48

8. Conclusion.....	49
II Transformation par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	49
1. Transformation des explants racinaires.....	50
1-1 Optimisation des conditions de la transformation.....	51
1-2 Test histochimique.....	53
1-3 Conclusion	54
2. Transformation des explants foliaires et cotylédonaire.....	54
2-1 Evénement transformationnel précoce	57
2-2 Effet d'une préculture	58
2-3 Conclusion	61
3. Adhésion bactérienne.....	62
3-1 Condition sans préculture.....	62
3-2 Condition avec préculture.....	63
3-3 Conclusion	64
4. Détection de protéine type vitronectine et fibronectine.....	68
5. Analyse de l'activité β -glucuronidase chez les plantes transgéniques.....	71
5-1 Activité du gène uidA chez les plantes transformées par la souche pGSGGLUC1	71
5-1 Analyse histochimique	71
5-2 Test spectrofluorimétrique.....	77
6. Activité du gène uidA dans les plantes transformées par la souche pTDE4....	82
6-1 Analyse histochimique	82
6-2 Mesure spectrofluorimétrique	90
7. Expression de la néomycine phosphotransférase II.....	91
8. Analyse moléculaire des plantes transformées.....	94
8-1 Caractérisation moléculaire des plantes transformées par la construction pTDE4.....	94
8-2 Caractérisation moléculaires des plantes transformées par la construction pGSGGLUC1	98
9. Analyse de la génération F1	100
III. Transformation par électroporation.....	103
1. Isolement des protoplastes et électroporation.....	103
1-2 Electroporation.....	104
Discussion	
I. Régénération et enracinement des bourgeons de la chicorée.....	108

II. Transformation des différents organes de la chicorée.....	109
1. Transformation des explants racinaires	110
2. Transformation des explants foliaires et cotylédonaire.....	112
3. Protéines de la matrice extracellulaire.....	115
4. Conclusion	117
III. Analyses des transformants.....	119
1. Analyse colorimétrique et spectrofluorimétrique chez les régénérants contenant TR2'-uidA	119
2. Analyse colorimétrique et spectrofluorimétrique chez les régénérants contenant la souche contenant 35 S CaMV-uidA.....	122
3. Test NPTII	126
4. Caractérisation moléculaire des plantes transgéniques	127
5. Transmission du caractère résistance à la kanamycine.....	128
IV. Transformation par électroporation.....	129
Références bibliographiques.....	137
Résumé	167

ABREVIATIONS

2,4-D: acide-2,4-dichlorophénoxyacétique	min : minute
ABA : acide abscissique	mm : millimètre
ADN : acide désoxyribonucléique	m/v : masse/volume
ADN-T : ADN de transfert	NAM : naphthyl acétamide
AIA : acide β -indolylacétique	NPTII : néomycine phosphotransférase II
APS : ammonium persulfate	PBS : Phosphate Buffer Saline
ATP : adénosine tri-phosphate	p/v : poids pour volume
BAP : benzylaminopurine	PEG : polyéthylène glycol
BSA : Bovine Serum Albumine	PM : poids moléculaire
cpm : Coups par minute	s : seconde
$^{\circ}\text{C}$: degré Celsius	SDS : sodium dodécylsulfate
Cie : Curie	SSC : Standard Sodium Citrate buffer
dATP : 2'-desoxyadénine 5'-triphosphate	TAE : Tris-Acétate-EDTA
dCTP : 2'-desoxycytosine 5'-triphosphate	TE : Tris-EDTA
dGTP:2'-desoxyguanosine5'-triphosphate	TEMED : N, N, N', N',tétraméthyl- éthylène diamine
dTTP : 2'-desoxythymine 5'-triphosphate	Ti : tumor inducing
DTT : dithiothéitol	Tris : tris (hydroxyméthyl)
EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique	% : pourcent
HPES : Acide N-2hydroxyéthylpipérazine-N'- éthane sulfonique	v/v : volume/volume
g : gramme	
GA ₃ : acide gibbérellique	
GUS : β -glucuronidase	
GUS INT : β -glucuronidase avec intron	
h : heure	
kb : kilo base ou kilo paire de base	
l : litre	
m : mètre	
M : molaire	
mg : milligramme	

INTRODUCTION

Introduction

Cichorium intybus L. (var. Witloof) ou chicorée de Bruxelles est une Astéracée bisannuelle. Semée en avril-mai, la graine produit une racine qui arrive à maturité en octobre-novembre et qui porte une rosette de feuilles vertes. Ce bouquet foliaire, appareil photosynthétique de la plante permet, de juillet à octobre, l'accumulation des réserves sous forme d'inuline dans la racine. Ces réserves servent dès le printemps de l'année suivante à l'édification d'une hampe florale portant des capitules à fleurs ligulées (Figure 1). La chicorée est une plante allogame ; toutefois cette allogamie n'est pas stricte et des semences sont produites par autofécondation lorsque les plantes sont isolées et mises en présence d'agents pollinisateurs (Pécaut, 1958). L'appareil reproducteur est un ensemble d'inflorescences portées par des ramifications en nombre et en ordre plus au moins variables et ayant des développements asynchrones. Le nombre de fleurs par capitule est de l'ordre d'une vingtaine. La floraison s'échelonne sur environ trois mois. La récolte des fruits, akènes de couleur blanche, noire ou panachée, a lieu d'août à septembre.

Dans la pratique agricole courante, les racines tubérisées mûres sont récoltées en novembre, débarrassées de leurs feuilles et mises en forçage à l'obscurité et à 18°C. En moins de trois semaines le bourgeon se développe produisant des feuilles étiolées étroitement imbriquées : l'endive ou le chicon.

Cette production est surtout répandue en France, en Belgique ainsi qu'aux Pays-Bas, où elle occupe respectivement environ 15000, 8000 et 4000 hectares.

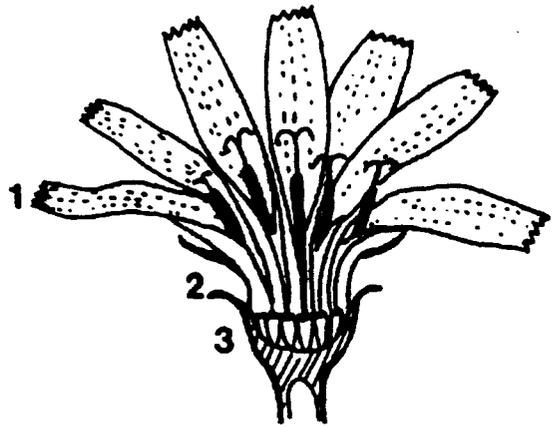
La chicorée de Bruxelles est une espèce qui présente de remarquables propriétés d'organogenèse. Elle est en effet capable de régénérer des plantes entières à partir de tous ses organes : racines, feuilles vertes ou étiolées (Toponi, 1963 ; Vasseur, 1986), pistils (Dubois *et al.*, 1988) ou anthères (Guedira *et al.*, 1989).

La transformation génétique de la chicorée est une alternative intéressante pour la sélection de souches résistantes par cultures cellulaires. Disposer d'une méthode efficace de transformation génétique de la chicorée constitue un intérêt à la fois pratique, d'ordre phytotechnique, et plus fondamental comme moyen d'études cellulaires et moléculaires.

Ainsi nous avons choisi de transformer génétiquement la chicorée (*Cichorium intybus* L. var Witloof) par *Agrobacterium* et par électroporation.

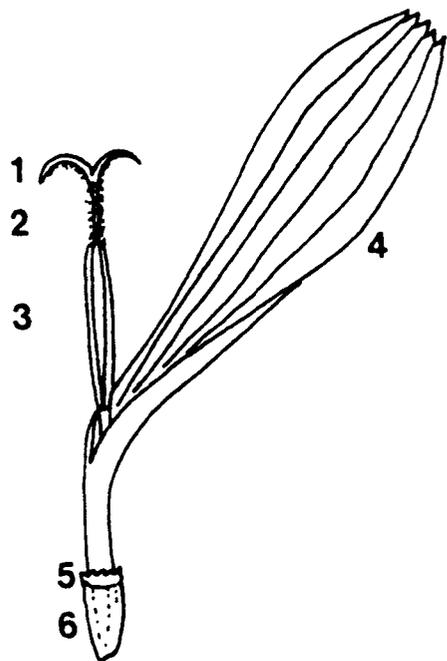


Rameau florifère (x 0,3)



Capitule épanoui
(coupe longitudinale, x 1,5)

- 1 : ligules
- 2 : double involucre de bractées
- 3 : réceptacle floral



Fleur épanouie (x 5)

- 1 : stigmate
- 2 : style
- 3 : manchon staminal
- 4 : ligule
- 5 : pappus
- 6 : ovaire uniloculaire

Figure 1. Représentation schématique de la morphologie florale chez *Cichorium*.

La transformation *via Agrobacterium* est utilisée avec succès chez d'innombrables espèces végétales. De plus, la chicorée est une espèce sensible aux agrobactéries (Palms *et al.*, 1989 ; Sun *et al.*, 1991 ; Vermeulen *et al.*, 1992). Par ailleurs, le fragment d'ADN transféré aux cellules végétales est en général défini et peu soumis à des événements de réarrangement ; c'est pour cette dernière raison que la législation actuelle d'acceptation de la culture au champ de plantes transgéniques devient plus favorable aux plantes transformées par *Agrobacterium*.

Agrobacterium rhizogenes produit généralement des plantes transgéniques avec un système racinaire abondant et très ramifié (Jouanin *et al.*, 1987). Ces plantes, phénotypiquement modifiées, sont peu exploitables agronomiquement. Nous avons donc choisi d'utiliser *Agrobacterium tumefaciens*.

L'électroporation permet de tester rapidement de nouvelles constructions de gènes et de définir des séquences de régulation par délétion de promoteurs. Elle permet aussi l'étude de l'expression transitoire et stable des gènes introduits dans des protoplastes. En outre, plusieurs auteurs relatent la régénération des plantes à partir de protoplastes de différents génotypes de chicorée (Crepy *et al.*, 1982 ; Sasaki *et al.*, 1986 ; Dubois *et al.*, 1990 ; Rambaud *et al.*, 1990). Ainsi, nous avons choisi d'utiliser l'électroporation pour étudier l'expression transitoire chez la chicorée.

Nous nous sommes servi de trois vecteurs binaires pour la transformation de la chicorée: le vecteur pGSGGLUC1, le vecteur pTDE4 et le vecteur pVD1124, conférant tous une résistance à la kanamycine. Les ADN-T de ces constructions portent les mêmes gènes :

- le gène *uidA* d'*E. coli* code pour la β -glucuronidase. Cette enzyme catalyse le clivage de nombreux β -glucuronides dont les produits de dégradation peuvent être dosés par fluorimétrie ou détectés par coloration histochimique. Le test GUS est un test simple, rapide et remarquablement stable dans les cellules et dans les tissus. L'analyse histochimique qu'il permet, offre par son biais des informations concernant l'expression spatio-temporelle du gène.

- le gène *nptII* du transposon Tn5, code pour la néomycine phosphotransférase II (NPT-II) qui confère la résistance aux aminoglycosidiques et donc à la kanamycine. C'est un gène de sélection fiable, qui est utilisé fréquemment dans des constructions de vecteurs servant à la transformation de très nombreuses plantes. C'est aussi un gène stable chez qui aucune mutation spontanée n'a été jusqu'à présent rapportée.

Ces gènes sont régulés par des promoteurs différents : les gènes de l'ADN-T de la construction pGSGluc1 sont contrôlés par un promoteur double TR 1', 2' de la mannopine synthase ; ceux du pTDE4 sont contrôlés par deux promoteurs différents. Le promoteur 35 S du Virus de la Mosaïque du Chou-fleur (CaMV) contrôle le gène *uidA* et le promoteur *nos* de la nopaline synthase précède le gène *nptII*. Les gènes de l'ADN-T du vecteur pVD1124 sont contrôlés par les mêmes promoteurs que ceux du vecteur pTDE4 si ce n'est que la séquence codante du gène *uidA* contient un intron.

A l'aide de ces constructions, nous avons voulu définir :

- les conditions de transformation de différents organes (explants de racines tubérisées, de feuilles et de cotylédons) de la chicorée,
- la localisation de l'expression du gène *uidA* régulée par le promoteur 35S et celle régulée par le promoteur TR et cela dans différents tissus et en fonction des stades de développement des plantes transformées,
- d'analyser la transmission des transgènes aux générations suivantes et ses effets sur la physiologie de la cellule.

Par ailleurs, à l'aide d'un électroporateur à décroissance exponentielle, nous avons voulu mettre au point une méthode d'électroporation pour la transformation des protoplastes de la chicorée.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

En l'espace d'une dizaine d'années, l'amélioration des conditions de régénération de plantes et la maîtrise grandissante des méthodes de transgénèse, essentiellement celles basées sur l'utilisation de systèmes dérivés d'un transfert indirect ou direct des gènes ont permis un élargissement considérable du spectre des espèces végétales accessibles à la transgénèse.

Le transfert indirect se fait par l'intermédiaire d'un vecteur naturel : *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*.

Les techniques de transfert direct de gènes où l'ADN nu est introduit dans des protoplastes, dans des cellules intactes ou dans des tissus entiers, sont surtout développées pour la transformation des monocotylédones qui sont difficilement transformables par *Agrobacterium tumefaciens*. Ainsi, pour surmonter ces problèmes chez les monocotylédones et chez certaines espèces de dicotylédones récalcitrantes à *Agrobacterium*, diverses stratégies de transformation sont développées. Ce sont des méthodes chimiques combinées ou non à des méthodes électriques physiques telles que la microinjection et l'emploi de méthodes biolistiques ("canon à particule").

1. Transfert direct de l'ADN

Cette approche fait intervenir plusieurs méthodes chimiques, physiques ou électriques pour introduire un fragment d'ADN dans une cellule végétale sans intermédiaire biologique. Elles permettent d'envisager le transfert de fragments d'ADN non clonés et n'imposent pas de limite due à une spécificité d'hôte. Les premières méthodes de transfert direct ont été mises au point sur les cellules animales qui, à la différence des cellules végétales, n'ont pas de parois pecto-cellulosiques qui limitent le passage de macromolécules telles que l'ADN.

Parmi ces techniques on peut citer la transformation en présence de polyéthylène glycol (PEG) et de polyornithine (Davey *et al.*, 1980 ; Draper *et al.*, 1982) ou en présence de calcium (Krens *et al.*, 1982). La transformation par le PEG a été utilisée avec succès chez *Lolium multiflorum*, (Potrykus *et al.*, 1985), le maïs (Lyznik *et al.*, 1991), le riz (Lee *et al.*, 1991) et *Brassica oleracea* L. var. botrytis (Eimert et Siegmund, 1992). Cependant, dans la plupart des cas, la fréquence de transformation est faible (10^{-5} à 10^{-6}) et l'expression transitoire est plus fréquente que l'intégration stable. De plus, la concentration du PEG influence la viabilité des protoplastes en raison de sa toxicité et provoque des fusions de protoplastes à une fréquence

élevée (Jones *et al.*, 1987). Parfois des plantes génétiquement anormales sont obtenues et n'atteignent pas le stade de maturité ou de floraison. Pour éviter les méfaits du PEG, d'autres techniques sont développées telles l'encapsulation d'ADN à transférer dans les liposomes, microvésicules artificielles de phospholipides qui sont fusionnées avec des protoplastes (Caboche et Deshayes, 1984 ; Deshayes *et al.*, 1988). Une autre alternative, la microinjection, consiste à injecter l'ADN dans les protoplastes, le pollen et l'embryon (Crossway *et al.*, 1986 ; Spangenberg *et al.*, 1986 ; Reich *et al.*, 1988). Cette technique a permis d'obtenir des taux élevés de transformants pouvant atteindre 1 à 30%, mais elle ne peut pas s'appliquer à tous les organismes pour de simples questions de taille des cellules. De plus, la microinjection est une manipulation délicate qui nécessite un appareillage spécial. D'autres techniques utilisent le transfert de gènes par sonication (Joersbo et Brunstedt, 1990), par laser (Weber *et al.*, 1988) par bombardement avec un appareil à air comprimé (Oard *et al.*, 1990) ou tout simplement par imbibition passive de l'ADN sur les tubes polliniques (Luo *et al.*, 1989) ou au cours de la réhydratation des cellules comme cela a été fait sur les embryons somatiques de luzerne (Seneratna *et al.*, 1991).

Ces alternatives pour la transformation permettent une expression transitoire ou stable mais leurs reproductibilités restent faibles.

Une méthode récente de transfert direct utilisée pour les plantes récalcitrantes à *Agrobacterium* est l'emploi du canon à particule. C'est une méthode simple qui permet d'entraîner l'ADN dans différents tissus végétaux à l'aide d'un microprojectile de bombardement constitué de billes en or ou en tungstène (Klein *et al.*, 1987). L'ADN adsorbé est accéléré à travers les parois et les membranes cellulaires. Cette méthode est la plus performante, actuellement, pour la transformation des monocotylédones (Mc Cabe *et al.*, 1988 ; Fromm *et al.*, 1990 ; Gordon-kamm *et al.*, 1990 ; Christou *et al.*, 1991 ; Bower et Brich., 1992 ; Vasil *et al.*, 1992 ; Li *et al.*, 1993). Une proportion relativement faible de cellules bombardées (10^{-3} à 10^{-2}) intègre et exprime de façon stable le gène étranger (Tomes *et al.*, 1990; Franche, 1991). La biolistique est une méthode de transgénèse fiable qui a permis un élargissement considérable du spectre des espèces végétales accessibles à la transformation.

Une autre technique de transformation est l'électroporation. C'est une technique largement employée pour la transformation des monocotylédones qui présentent un intérêt agronomique et économique très important. Cette méthode est aussi utilisée pour des espèces de dicotylédones comme *Solanum melongena* (Komari *et al.*, 1989) et *Vitis vinifera* (Baribault *et al.*, 1990) qui sont récalcitrantes à *Agrobacterium tumefaciens*. L'électroporation est une méthode qui permet

l'étude de la régulation des gènes chez les plantes (Davey *et al.*, 1989 ; Goupil *et al.*, 1992). Grâce à cette technique un certain nombre de plantes durablement transformées a pu être obtenu (Rhode *et al.*, 1988 ; Shimamoto *et al.*, 1989 ; Potrykus *et al.*, 1990). L'électroporation est une technique simple, reproductible et qui peut donner des fréquences de transformation élevées; sa bonne application est dépendante de la capacité à la régénération de plantes fertiles (Potrykus, 1990). Cependant plusieurs variables affectent ce transfert direct de gènes tels que la durée et le nombre de chocs électriques, l'intensité du champ électrique, les conditions ioniques, la température, les concentrations de l'ADN, la taille et le nombre de protoplastes et la présence ou l'absence d'ADN entraîneur. La forme de la décharge électrique est également importante. En effet, selon l'électroporateur utilisé, l'impulsion électrique peut être soit carrée, soit à décroissance exponentielle. Dans l'onde carrée, le voltage s'accroît brusquement de zéro à l'amplitude fixée ; il y est maintenu pendant un temps déterminé, puis redescend à zéro. Avec la décroissance exponentielle, la différence de potentiel appliquée aux bornes de la chambre de l'électroporateur est élevée à une valeur initiale V_0 , puis décroît de manière exponentielle. La durée de l'impulsion exponentielle est représentée par le temps nécessaire pour que le voltage atteigne 37% de sa valeur initiale. La constante de temps correspond à $T = RC$ (T = constante de temps en secondes ; R = résistance entre les électrodes de la chambre d'électroporateur en Ohms ; C = capacité en Farads).

L'intensité du champ électrique est obtenue par l'équation suivante : $E = V/d$ (E = intensité du champ électrique en volts ; V = différence de potentiel en volts ; d = distance entre les électrodes en cm) ; dans la plupart des expériences d'électroporation, où la distance entre les électrodes est fixée pendant l'impulsion électrique, l'intensité du champ électrique suit la diminution du voltage du condensateur : $E_t = E_0 e^{-t/T}$ (E_t = intensité du champ électrique au temps t (V/cm) ; E_0 = intensité initiale (en V/cm) ; t = temps (en secondes) ; T = constante de temps (en secondes)). La résistance R de l'échantillon est inversement proportionnelle à la force ionique du tampon d'électroporation.

E_0 et T sont les deux paramètres électriques les plus importants. L'intensité du champ peut être ajustée en faisant varier la différence de potentiel ou la distance entre les électrodes. La constante de temps T peut être modifiée en changeant la puissance du condensateur ou en changeant la résistance de l'échantillon qui est dépendante de la force ionique du milieu.

L'électroporation est une technique qui a été développée dans les années 80 et qui exploite les propriétés physiques des membranes cellulaires. En effet l'action d'un champ électrique sur les protoplastes crée une différence de potentiel transmembranaire qui provoque une désorganisation de la membrane qui devient dès lors perméable à diverses molécules

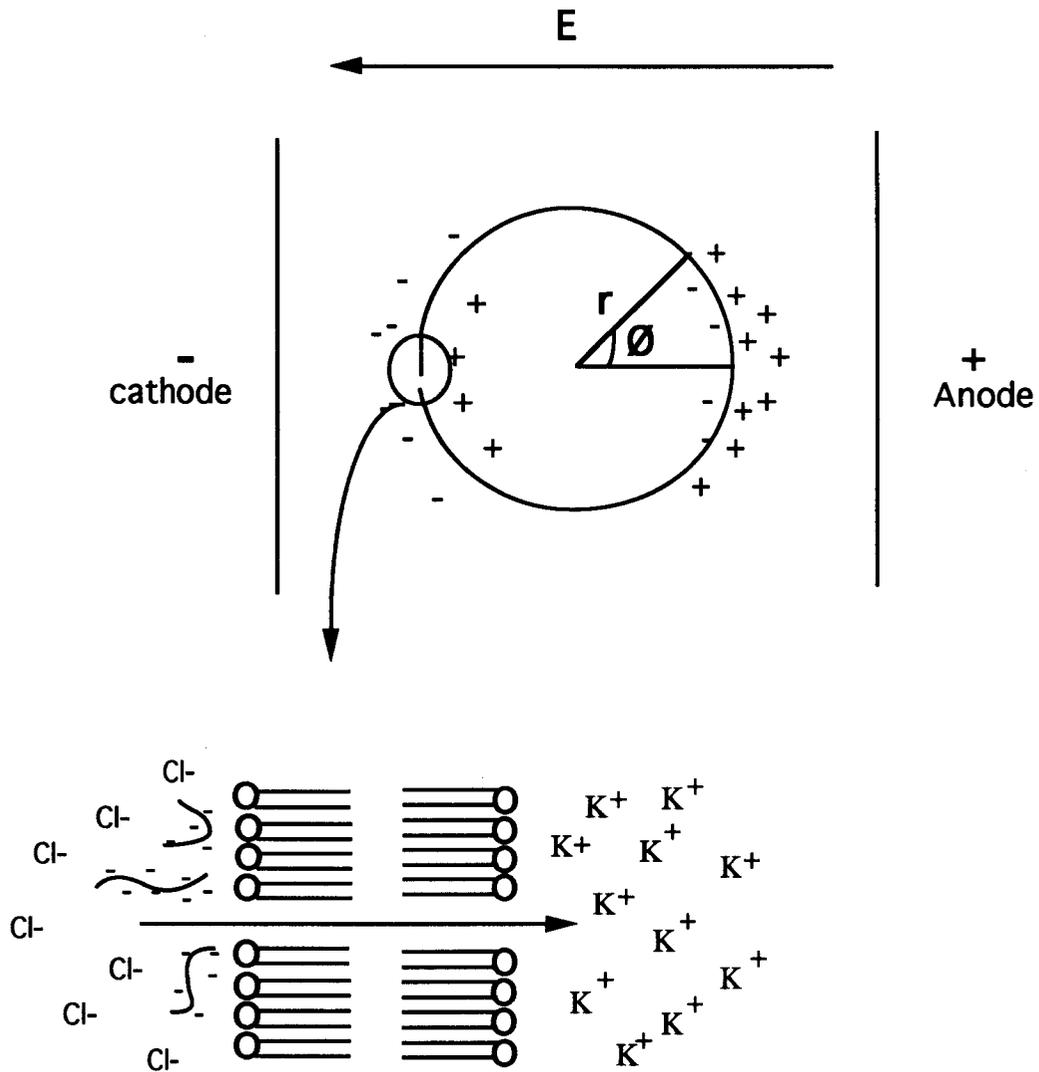


Figure 2: Diagramme d'une cellule exposée à un champ électrique E (d'après Jones *et al.*, 1987).

E : différence de potentielle

 Fragment d'ADN

 Couche lipidique

r : Rayon du protoplaste

\emptyset : Angle formé par les sites membranaires du protoplaste avec les lignes du champ E

exogènes. Ce phénomène d'électroperméation peut être réversé. L'amplitude du potentiel transmembranaire (V) est proportionnelle au champ électrique (E) et au rayon (r) du protoplaste, selon l'équation $V = 1,5 \cdot E \cdot r \cdot \cos \theta$ (Zimmermann, 1982). L'angle θ correspond à l'angle formé entre les sites membranaires sur la surface des protoplastes avec les lignes du champ (E) (Fig 2).

La séparation de charge à travers le plasmalemme entraîne l'apparition d'une force électrostatique conduisant à une compression de la membrane et à la formation de pores. Si les cellules sont d'abord en contact étroit, l'impulsion électrique entraîne la fusion des protoplastes (Templan et Jones, 1985).

La formation des pores n'a lieu que lorsque le voltage (V) appliqué à la membrane devient supérieur à la valeur du potentiel transmembranaire (V_c) toujours présente. Le champ électrique (E) s'ajoute au potentiel membranaire (V_c) (une différence de potentiel d'environ -100 mV existe au niveau du plasmalemme). Quand le champ électrique est important ($V > V_c$) un grand nombre de pores se forment d'abord à l'équateur des protoplastes, à l'opposé de l'anode. Lorsque le champ électrique appliqué traverse toute la cellule, les pores se forment sur les deux faces (côté anode et cathode) du protoplaste.

L'électroporation a été utilisée avec succès pour introduire des gènes étrangers chez le riz (Toriyama *et al.*, 1988 ; Zhang *et al.*, 1988 ; Shimamoto *et al.*, 1989 ; Battraw et Hall, 1992), le soja (Dhir *et al.*, 1991) et le citrus (Hidaka et Omura, 1993).

Un grand nombre de paramètres électriques et biologiques est mis en jeu dont seule la maîtrise conditionne le succès du transfert direct de gènes. Bénéficiant d'un électroporateur à décroissance exponentielle au laboratoire, nous avons naturellement choisi l'utilisation de l'électroporation pour la transformation des protoplastes de la chicorée.

2. Transfert indirect de l'ADN

2-1 Transformation par voie virale

Un vecteur naturel utilisé pour le transfert des gènes étrangers dans les plantes est le système viral. Le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) et les virus gémeaux ont été particulièrement utilisés. Les virus à ARN sont également utilisés pour le transfert des gènes. Le taux de transformation obtenu par les systèmes viraux est de 1 à 50%. Cependant ces systèmes

sont généralement très spécifiques de l'hôte et la mise au point de tels vecteurs nécessite des travaux beaucoup plus importants qu'un autre système de transformation. De plus les systèmes viraux présentent trois inconvénients qui limitent leur utilisation. Premièrement, tous les virus ne sont pas transmissibles par les graines et le caractère introduit doit être ajouté par réinfection à chaque génération (Grimsley *et al.*, 1987). Deuxièmement, les virus ne peuvent pas transférer de grands fragments d'ADN étranger et finalement, les virus pourront, par d'éventuels réarrangements, devenir dangereux pour la plante et l'environnement.

2-2 Transformation par voie bactérienne

Jusqu'à présent, *Agrobacterium tumefaciens* est le système naturel qui présente la meilleure efficacité de transformation génétique des plantes supérieures sans remaniement important du génome de la plante. *Agrobacterium rhizogenes* produit généralement des plantes transgéniques avec un système racinaire abondant et très ramifié (Jouanin *et al.*, 1987). Ces plantes, phénotypiquement modifiées, sont peu exploitables agronomiquement.

2-3 La galle du collet

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie du sol Gram négative de la famille des *Rhizobiaceae*. Elle infecte une grande gamme de gymnospermes et d'angiospermes dicotylédones et récemment il a été démontré qu'elle peut également infecter quelques monocotylédones.

Le processus d'infection nécessite une blessure de la plante et l'attachement polaire de la bactérie à la membrane des cellules végétales. Il en résulte, après une séquence d'événements complexes, des tumeurs : la galle du collet. Dès qu'il y a induction de la tumeur, la bactérie n'est plus nécessaire à la croissance tumorale. Les tumeurs se distinguent des cals non transformés par deux caractéristiques :

- 1- dans des conditions aseptiques, les tumeurs sont capables de se développer, sur un milieu minéral synthétique sans aucune addition d'hormones, alors que les cals nécessitent très souvent l'addition d'hormones pour leur croissance *in vitro*.
- 2- les tumeurs produisent des composés azotés particuliers, dérivés des acides aminés: les opines. Ce sont des composés organiques spécifiques aux souches bactériennes. Elles ne sont

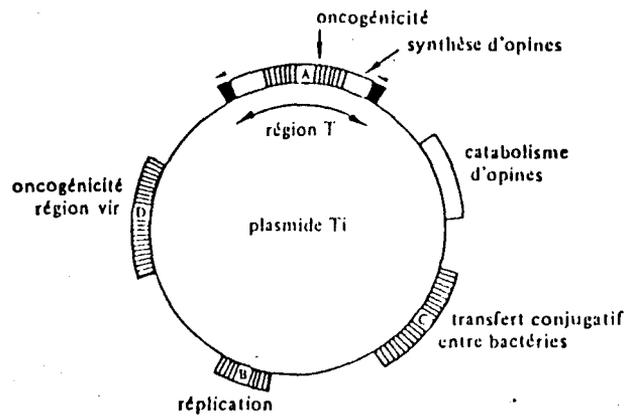


Figure 3 : Représentation schématique d'un plasmide Ti. Les régions hachurées sont homologues entre plasmides à octopine et à nopaline.

pas métabolisées par la cellule végétale, mais constituent une source d'azote et de carbone pour les bactéries (Guyon *et al.*, 1980 ; Hille *et al.*, 1984 ; Hooykaas et Schilperoort, 1984 ; Petit et Tempé, 1985). Les fonctions cataboliques des opines sont portées par le plasmide Ti, mais ne sont pas intégrées dans le génome végétal : ces gènes sont en effet situés dans la partie non transférée du plasmide.

La tumeur provient d'une intégration stable d'un élément génétique du plasmide Ti présent dans *Agrobacterium*. Après une infection, la bactérie est capable de transférer un fragment d'ADN : l'ADN-T, porté par le plasmide Ti, dans le génome de la plante. Les gènes insérés dans l'ADN-T sont cotransférés et intégrés dans le génome de la plante.

2-4 Structure et fonction du plasmide Ti

Les plasmides Ti sont classés d'après les opines qu'ils déterminent. Les types les mieux étudiés sont les plasmides à nopaline et à octopine. L'organisation fonctionnelle de ces deux types de plasmides a été comparée (Figure 3). Il y a quatre régions d'homologie au niveau de la séquence de l'ADN. Deux régions conservées (A et D) contiennent des gènes essentiels pour l'oncogénicité. La région A fait partie de l'ADN-T ; la région D appelée région *vir*, est exprimée dans la bactérie et dirige l'interaction bactérie-plante ainsi que le transfert de l'ADN-T. La région B contient l'origine de répllication du plasmide Ti et la région C détermine des fonctions de transfert conjugatif.

Dans le cas du plasmide de la souche C58 à octopine, deux segments contigus sont présents dans les lignées transformées. le "TL" (ADN-T gauche) de 14 kb est toujours présent et contient la région commune avec l'ADN-T à nopaline (la région d'homologie A). Le segment TR (ADN-T droit) de 7kb n'est pas toujours présent et contient des gènes qui codent pour la biosynthèse de plusieurs opines.

2-5 Fonctions des gènes de l'ADN-T

L'ADN-T contient essentiellement deux groupes de gènes (Figure 4) :

- les gènes responsables de la croissance des tumeurs
- les gènes codant pour la synthèse des opines.

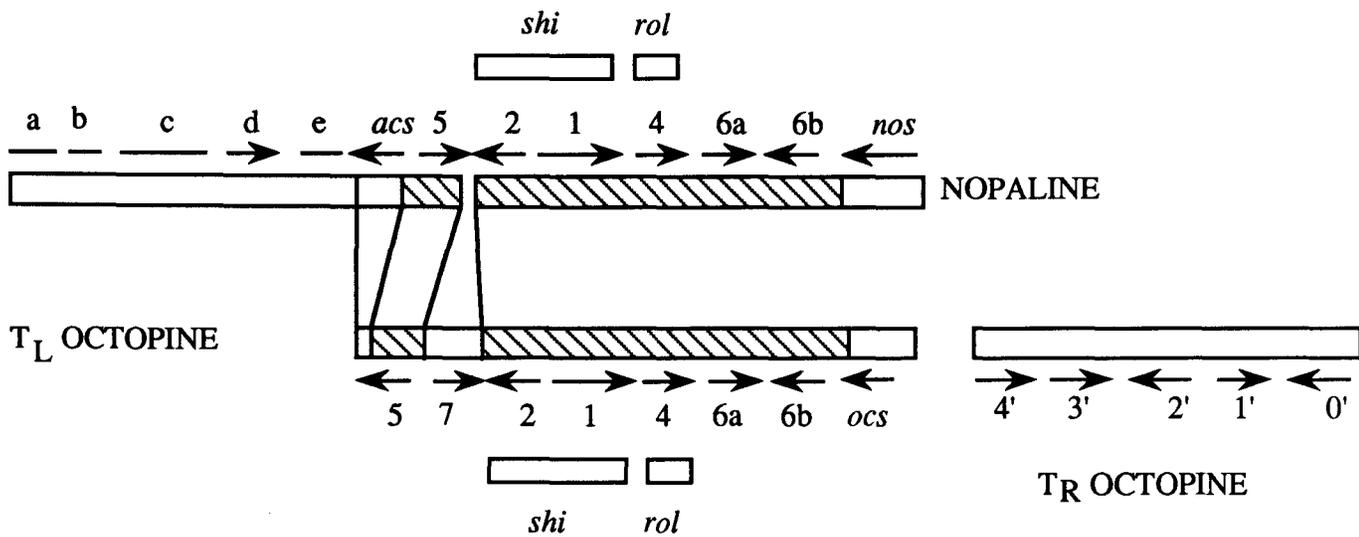


Figure 4 : Organisation fonctionnelle de l'ADN-T à nopaline (au dessus) et à octopine (en dessous) des plasmides Ti. Les flèches indiquent les différents gènes et le sens de transcription dans les cellule végétales. La nomenclature suit les désignations d'origine par rapport à la taille de transcription (Willmitzer *et al.*, 1982 et 1983 ; Velten *et al.*, 1983). *Nos* : synthèse de nopaline ; *acs* : synthèse d'agrocinopine ; *ocs* : synthèse d'octopine ; *Roi* : inhibition de racines (aussi nommé *tmr* "tumor morphology roots" (Garfinkel *et al.*, 1981) ; *Shi* : "Shoot inhibition" (aussi nommé *tms* " tumor morphology shoots" (Garfinkel *et al.*, 1981) ; Les régions en lignes hachurées sont des régions d'homologie entre les deux types d'ADN-T.

L'action conjuguée de trois gènes (*iaaM*, *iaaH* et *ipt*) détermine le caractère tumoral et la morphologie de la tumeur. Les gènes (*iaaM* et *iaaH*) codent pour la tryptophane-mono-oxygénase et l'indolacétamide-hydrolase qui sont impliquées dans la synthèse d'auxines. Le gène (*ipt*) code pour l'isopentényl-transférase qui intervient dans la biosynthèse des cytokinines.

L'effet simultané des gènes *iaaM*, *iaaH* et *ipt* provoque la biosynthèse d'hormones dans la cellule végétale, ce qui entraîne une prolifération continue non régulée des tissus végétaux. Ces gènes ont donc reçu le nom d'oncogènes.

En plus des gènes de synthèse d'auxine et de cytokinine, l'ADN-T contient d'autres gènes ne produisant de phénotype particulier. En effet, le gène 6b est capable, à lui seul, d'induire des tumeurs chez un nombre limité d'espèces comme le *Nicotiana glauca* et le *Kalanchoe tubiflora* (Hooykaas *et al.*, 1988). Quand il est combiné aux autres oncogènes, il module la tumorigénèse (Leemans *et al.*, 1982 ; Spanier *et al.*, 1989 ; Tinland *et al.*, 1989). Le gène 5 module l'activité des facteurs de croissance. En effet, il est impliqué dans la synthèse d'un analogue d'auxine : l'acide indole lactique. Dans les plantes dérégulées par les transgènes impliqués dans la synthèse d'auxine, l'IAL protège ces plantes en question contre l'effet toxique de l'auxine en se liant compétitivement à aux récepteurs d'auxine (Schell *et al.*, 1993). Le promoteur du gène 5 est activé en présence de taux élevés d'auxine et il est négativement régulé par un antagoniste d'auxine.

Les gènes a, b, c, d, e dans l'ADN-T à nopaline, le gène 7 dans le TL et les gènes 3' et 4' dans le TR à octopine ainsi que le gène 6a ont un rôle mineur dans la formation de la tumeur.

En ce qui concerne les gènes de synthèse d'opines, il y a les gènes de la nopaline synthase(nos) et le gène de l'agropinine synthase (acs) dans le plasmide à nopaline. De même on a pu localiser le gène codant pour l'octopine synthase (ocs) sur le segment TL de l'ADN-T à octopine, alors que le segment TR code pour différentes enzymes impliquées dans la synthèse des opines : les transcrits 1' et 2' sont nécessaires à la production de mannopine et le transcrit 0' est responsable de la conversion de la mannopine en agropine.

2-6 Système analogue : *Agrobacterium rhizogenes*

L'inoculation par *Agrobacterium rhizogenes* induit des phénotypes tumoraux différents. Il provoque une prolifération de racines due aux gènes de l'ADN-T du plasmide Ri ("root inducing"). Seules certaines souches transfèrent les gènes de biosynthèse d'auxine (White, et Nester, 1980). Le transfert de ces seuls gènes entraîne une faible formation de racines. Les principaux gènes impliqués dans la formation des racines sont les quatre gènes *rol* (*rolA*, *rolB*, *rolC* et *rolD*). Les gènes *rol* sensibilisent les cellules à l'auxine endogène et c'est probablement ce mécanisme qui provoque la formation de racines (Winans *et al.*, 1992). Les gènes *rolA*, *rolB* et *rolC* utilisés seuls ou combinés modifient la croissance des plantes transgéniques. En effet, le gène *rolA* provoque un phénotype gaufré des feuilles (Schmulling *et al.*, 1988). Le gène *rolB* code pour une β -glucosidase (Estruch *et al.*, 1991b) libérant l'AIA de sa forme conjuguée. L'augmentation de l'activité auxinique induit une modification morphologique des plantes lors de la floraison et une augmentation des nombres de racines sur les tiges (Nilsson *et al.*, 1993). Le gène *rolB* est capable à lui seul d'induire des racines chez *Kalanchoe diargremontiana*. Quand il est muté, il provoque une avirulence d'*Agrobacterium rhizogenes* chez cette plante (Spena *et al.*, 1987). De même, le gène *rolC* code pour une β -glucosidase (Estruch *et al.*, 1991a) qui permet de libérer les cytokinines actives à partir de leur forme glucosidiques conjuguées. Le gène *rolC* augmente la capacité de croissance des racines transformées, réduit la dominance apicale, la production des graines et altère la morphologie des feuilles (Schmulling *et al.*, 1988). Malgré que la souche A4 d'*Agrobacterium rhizogenes* possède un gène homologue (*tzs*) au gène *ipt* il n'est pas transféré dans les cellules (Regier *et al.*, 1989). Ainsi aucune souche d'*Agrobacterium rhizogenes* ne transfère le gène *ipt*. En plus des oncogènes, l'ADN-T d'*Agrobacterium rhizogenes* contient aussi des gènes pour la biosynthèse des opines.

Bien qu'*Agrobacterium rhizogenes* et *Agrobacterium tumefaciens* aient des caractéristiques spécifiques, ils présentent certains points communs. En effet, ils induisent une prolifération des cellules et une synthèse d'opines après insertion de l'ADN-T dans les cellules. De plus, la région de virulence du plasmide Ri étant homologue à celle du plasmide Ti. Ainsi le mécanisme de transfert de l'ADN-T chez ces agrobactéries est identique.

2-7 Mécanisme moléculaire du transfert de l'ADN-T

Le mécanisme de transfert de l'ADN-T inclut au moins deux étapes. Premièrement, l'interaction de la bactérie avec les cellules de la plante qui initie une série d'événements activant des gènes spécifiques dans la bactérie (Matthyse, 1984) et qui permettent le transfert de l'ADN-T dans les cellules de la plante. Deuxièmement la recombinaison de l'ADN-T avec le génome végétal qui se termine par une intégration stable.

Le processus de transfert nécessite la présence de deux régions différentes du plasmide Ti : les frontières de l'ADN-T et les gènes de virulence ou gènes *vir*. Les séquences flanquant l'ADN-T sont constituées par 25 paires de bases directement répétées (Zambryski, 1988). Ces 25 pb sont très homologues entre les différents types de plasmides. Elles dirigent le transfert de l'ADN-T. En effet ce transfert est polaire. Le bord droit "BD" est nécessaire et suffisant pour le transfert et l'intégration de l'ADN-T dans le génome végétal ; le bord gauche "BG" a un effet moindre dans le transfert.

Les gènes de virulence sont au nombre de 8 opérons : *vir* A, B, C, D, E, F, G et H. (Garfinkel et Nester, 1980 ; Ooms *et al.*, 1980 ; Stachel et Nester, 1986 ; Kanemoto *et al.*, 1989). Les protéines codées par ces gènes *vir* ont trois fonctions. Elles reconnaissent un hôte approprié et disponible, elles catalysent le processus de transfert de l'ADN-T, en générant un ADN-T intermédiaire qui est transféré et elles assurent le transport de l'ADN-T intermédiaire à travers l'enveloppe bactérienne jusqu'à arriver dans le noyau de la cellule végétale.

Les gènes de virulence sont induits par une série de composés phénoliques produits par les cellules végétales (Stachel *et al.*, 1985 ; Stachel et Nester, 1986), par un milieu de croissance acide (Stachel *et al.*, 1986) et certains monosaccharides (Cangelosi *et al.*, 1990 ; Shimoda *et al.*, 1990). Dans ces conditions, le plasmide Ti produit un ADN-T simple brin qui est un intermédiaire dans le processus de transfert (Bilang *et al.*, 1992 ; Jasper *et al.*, 1994).

Les gènes *vir* A et *vir* G sont des gènes de régulation et leur expression est nécessaire à l'induction des gènes *vir* (Stachel et Zambryski, 1986 ; Rogowsky *et al.*, 1987 ; Winans *et al.*, 1988). En plus des composés phénoliques qui induisent les gènes de virulence, des monosaccharides comme le glucose et le galactose activent également ces gènes. Ces monosaccharides se lient à la protéine *chv* E qui rend plus sensible la protéine *Vir* A aux inducteurs phénoliques. (Shimoda *et al.*, 1990). Ainsi, la protéine *Vir* A qui est une kinase

transmembranaire, s'autophosphoryle et phosphoryle Vir G (Huang *et al.*, 1990 ; Jin *et al.*, 1990a ; Jin *et al.*, 1990b ; Morel *et al.*, 1990). Vir G se lie ensuite spécifiquement à des séquences de régulation impliquées dans l'activation des gènes de virulence. Le gène *vir G* est induit en plus par trois classes de stimuli : composés phénoliques produits par les plantes blessées, manque de phosphate dans le milieu et présence d'un milieu acide (Stachel et Zambryski, 1986 ; Veluthambi *et al.*, 1987 ; Winans *et al.*, 1988). La transcription du *vir G* est initiée au niveau de deux promoteurs P1 et P2. Le promoteur P1 est induit par les composés phénoliques et par un manque de phosphate dans le milieu (Stachel et Zambryski, 1986 ; Winans, 1990 ; Aoyama *et al.*, 1991), alors que le promoteur P2 semble être stimulé par un milieu acide (Winans, 1990).

La première réaction qui permet la synthèse du simple brin d'ADN est catalysée par les enzymes codées par le locus *vir D* qui code potentiellement pour cinq polypeptides. Vir D1 à Vir D5. La protéine Vir D5 n'est pas nécessaire à la virulence. En présence de la protéine Vir D1, la protéine Vir D2 coupe, au niveau des frontières un site spécifique pour former le simple brin de l'ADN-T (Yanofsky *et al.*, 1986 ; Jayaswal *et al.*, 1987) et reste attachée d'une façon covalente à l'extrémité 5' de l'ADN coupé (Herrera-Estrella *et al.*, 1988 ; Ward et Barnes, 1988 ; Young et Nester, 1988 ; Howard *et al.*, 1989 ; Vogel et Das, 1992 ; Jasper *et al.*, 1994). Cette réaction est la première étape dans la synthèse du brin intermédiaire. La protéine Vir D4 est nécessaire à la pathogénicité d'*Agrobacterium* (Stachel et Nester, 1986) alors que la protéine Vir D3 n'est pas essentielle pour la tumorigénicité de plusieurs espèces de plantes (Vogel et Das, 1992).

Le gène *vir C* code pour deux protéines Vir C1 et Vir C2 qui jouent un rôle déterminant dans l'orientation et dans l'efficacité du transfert de l'ADN-T (Toro *et al.*, 1989 ; Mozo et Hooykaas, 1992). Il semble que les protéines Vir C dirigent la protéine Vir D2 dans le processus de formation du fragment intermédiaire en commençant préférentiellement par la séquence du bord droit du simple brin. Les protéines Vir C se lient ensuite au bord droit et activent le transport de l'ADN-T.

Le gène *vir E* code pour deux protéines Vir E1 et Vir E2. Il a été montré que la protéine Vir E2 se lie au simple brin de l'ADN-T (Gietl *et al.*, 1987 ; Christie *et al.*, 1988 ; Citovsky *et al.*, 1988 ; Das, 1989) et peut protéger ainsi le fragment intermédiaire contre les activités endonucléasiques du cytoplasme bactérien ou végétal.

Le locus *vir B* code pour 11 polypeptides allant de Vir B1 à Vir B11. Ces polypeptides sont localisés au niveau de la membrane (Ward *et al.*, 1988 ; Shirasu *et al.*, 1990). Ils assurent le transport de l'ADN-T à travers la membrane (Ward *et al.*, 1991). Les gènes *vir B9*, *B10*, *B11* sont essentiels pour la tumorigénération (Ward *et al.*, 1990). Le gène *vir B10* produit une protéine qui se trouve contre la membrane interne d'*Agrobacterium tumefaciens* (Ward *et al.*, 1990), ce qui suggère que c'est un élément essentiel dans le transport de l'ADN-T. Le *vir B11* code pour une séquence d'acides aminés dont une partie est similaire à Com G1, protéine impliquée dans la prise et dans le passage de l'ADN à travers la paroi des cellules compétentes de *Bacillus subtilis* (Christie *et al.*, 1989 ; Albano *et al.*, 1989).

Les fonctions du *vir B* ne sont pas impliquées dans les réactions de coupure de l'ADN-T. Ces gènes ont une réaction tardive dans le processus de transfert de l'ADN-T d'*Agrobacterium* aux plantes ; ils permettent de former des pores membranaires favorisant le passage de l'ADN-T (Christie *et al.*, 1988 ; Ward *et al.*, 1988).

Le gène *vir F* code pour une protéine Vir F qui se trouve dans le cytoplasme bactérien et qui assure le transfert de l'ADN-T à partir d'*Agrobacterium* jusqu'aux cellules de la plante (Regensburg et Hooykaas, 1993).

Les opérons *vir A*, *vir G*, *vir B* et *vir D* sont donc absolument nécessaires pour le processus du transfert de l'ADN-T. Les opérons *vir C*, *vir E*, *vir F* sont surtout nécessaires pour certains hôtes d'*Agrobacterium*.

Par ailleurs, 3 gènes chromosomiques bactériens sont impliqués dans le processus d'attachement d'*Agrobacterium* aux cellules de la plante (Cangelosi *et al.*, 1987 ; Matthyse, 1987 ; Thomashow *et al.*, 1987). Les loci *chv B* et *exo C* sont impliqués dans la synthèse d'un polysaccharide cyclique le β -1,2 glucane (Puvanesarajah *et al.* 1987 ; Cangelosi *et al.*, 1987). Le locus *Chv A* est nécessaire au transfert de ce polysaccharide du cytoplasme au périplasme et au milieu externe (Das, 1988 ; Cangelosi *et al.*, 1989). Il n'est pas encore clair si le polysaccharide synthétisé sert à l'attachement d'*Agrobacterium* à la cellule végétale ou s'il affecte d'autres propriétés de la surface cellulaire permettant l'attachement.

L'enveloppe des bactéries à Gram⁻ pourrait également jouer un rôle dans le phénomène d'attachement. En effet, seules les structures bactériennes les plus externes sont susceptibles d'intervenir dans l'adhésion. Il s'agit :

- des liposaccharides et des protéines de la membrane externe,

- des polysaccharides capsulaires et extracellulaires,
- des structures fibrillaires émergeant du corps bactérien à savoir les microfibrilles de cellulose.

Ces différents composés pourraient participer à l'adhésion grâce à leur spécificité de structure. Ils pourraient agir comme récepteurs ou molécules spécifiquement reconnues par un récepteur porté par la surface d'un tissu végétal. En effet, chez *Rhizobium leguminosarum*, les lipopolysaccharides sont des structures qui reconnaissent chez le trèfle une lectine, la trifoliine A (Dazzo et Brill, 1979).

Les protéines de la membrane externe sont actuellement mal connues. La plupart de ces protéines sont liées de façon covalente à un peptidoglycane de la membrane externe. La participation d'une protéine membranaire, la rhicadhésine, à l'adhésion des bactéries sur les racines de pois a été démontrée (Smit *et al.*, 1992). Cette protéine a été isolée chez *Agrobacterium tumefaciens*. Swart *et al.* (1993) ont suggéré que cette molécule de 14 kD, la rhicadhésine, serait aussi codée par le chromosome d'*Agrobacterium* et nécessite pour être active, la synthèse du β -1,2 glucane. Par ailleurs, Kang et Delmotte (1992) ont mis en évidence la présence de lectines bactériennes chez *Agrobacterium tumefaciens* qui pourraient intervenir dans l'attachement d'agrobactéries aux cellules de la plante. Des molécules végétales peuvent également être impliquées dans l'attachement des bactéries mais elles n'ont pas été, jusqu'à présent, bien caractérisées. Récemment Wagner et Matthyse, (1992) ont montré qu'une protéine pariétale de type vitronectine, jouerait un rôle dans l'attachement des cellules aux substrats.

Deux autres gènes chromosomiques d'*Agrobacterium* codent aussi pour des protéines servant à l'attachement de la bactérie :

- le locus *cel* impliqué dans la synthèse des fibrilles de cellulose (Matthyse, 1983). Celles-ci agissent tardivement dans l'accrochage de la bactérie à la plante ; elles interviendraient dans la consolidation de la liaison bactérie-hôte.
- le locus *att* codant pour une protéine de surface cellulaire (Matthyse, 1987).

2-8 Vecteur de transformation basé sur le plasmide Ti

Le plasmide d'*Agrobacterium* peut être utilisé comme vecteur pour l'insertion de gènes étrangers dans le génome de la plante. Il suffit pour cela de remplacer les oncogènes par les

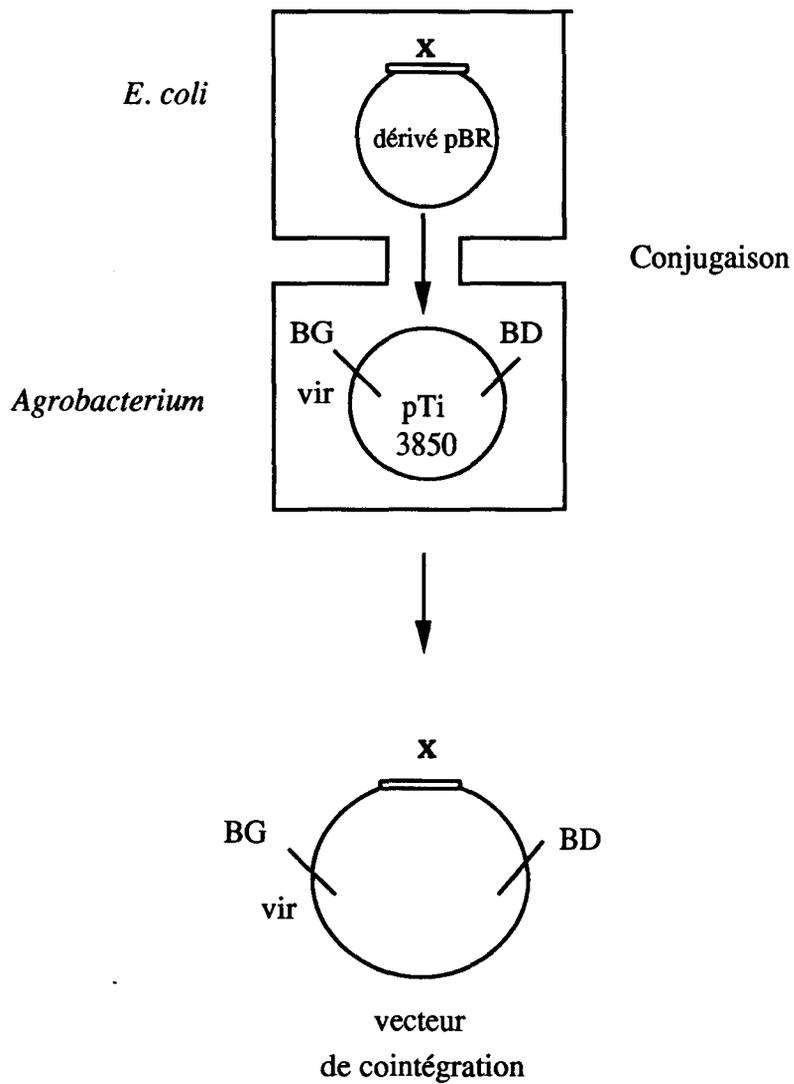


Figure 5 : Système de cointégration

Le gène *x* et un marqueur de sélection (non représenté) sont clonés dans le dérivé pBR. Ce plasmide est mobilisé vers *Agrobacterium* par conjugaison. La séquence entre les bords de l'ADN-T va être transférée dans les cellules de plantes.

gènes qui codent pour les caractères que l'on désire intégrer. Ainsi l'*Agrobacterium* qui en dérive conserve son aptitude à transférer les segments de l'ADN-T aux cellules de la plante.

Pour que l'ADN-T soit un vecteur utilisable, il faut que les conditions suivantes soient remplies :

- 1- l'ADN-T doit être flanqué par les frontières.
- 2- la souche bactérienne utilisée doit contenir les fonctions *vir* en *trans* ou en *cis*.
- 3- les cellules transformées doivent être capables de régénérer des plantes normales et fertiles ; c'est la raison pour laquelle les gènes oncogènes ont été éliminés car ils perturbent la différenciation normale de la plante.
- 4- le vecteur doit contenir en plus du gène à introduire, un gène marqueur de sélection.

Deux méthodes ont été développées pour introduire des gènes étrangers *via* les ADN-T dans les plantes :

- système de cointégration
- système binaire

2-8-1 Système de cointégration

Dans ce système le plasmide Ti est utilisé, mais les oncogènes sont remplacés par une séquence de pBR322 de *E. coli*. (Zambrisky *et al.*, 1988). Un exemple de système de cointégration est le pGV3850. C'est le premier plasmide Ti non oncogène fabriqué. L'intérêt d'une telle construction est que tout fragment d'ADN cloné dans le pBR322 peut facilement être intégré dans le plasmide pGV3850 par recombinaison homologe. Le pBR322 n'est pas un plasmide conjugatif mais il peut être mobilisé en présence de certains plasmides transférables (plasmides pRK "helper") qui fournissent des fonctions de transfert. Par recombinaison un cointégrat est formé et les agrobactéries contenant ce cointégrat peuvent être sélectionnées grâce à un marqueur de résistance à un antibiotique (Figure 5).

Le système de cointégration reconstitue un ADN-T fonctionnel avec les frontières droite et gauche. Il offre l'avantage d'un plasmide stable dans *Agrobacterium* et assure la transformation.

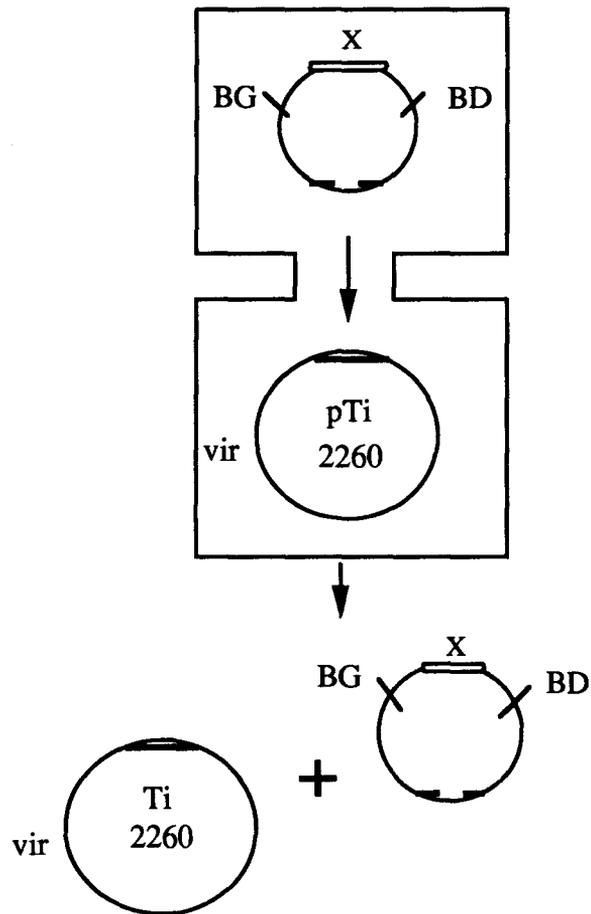


Figure 6 : Système binaire

Le gène x est cloné entre les bords de l' ADN-T. Le plasmide mobilisé vers *Agrobacterium*, est capable de se répliquer de façon autonome. Les fonctions *vir* sont fournies en *trans* par le plasmide pGV2260.

2-8-2 Système binaire

Ce système consiste en deux éléments séparés :

1- un vecteur désarmé capable de se répliquer dans *E. coli* et *Agrobacterium*. Il porte des sites de clonage uniques, un gène marqueur entre les bords de l'ADN-T, des marqueurs de sélection d'origine bactérienne ou végétale et les fonctions nécessaires à la mobilisation de *E. coli* vers *Agrobacterium*.

2- le plasmide Ti (exemple pGV2260) qui est délété pour la région T fournit en *trans* les fonctions *vir* nécessaires au transfert de l'ADN-T (Figure 6).

Le système binaire a été utilisé avec succès chez plusieurs espèces de plantes (De Framond *et al.*, 1983 ; Hoekema *et al.*, 1983 ; Simoens *et al.*, 1986). L'avantage des vecteurs binaires est qu'ils sont stabilisés avec une fréquence de 10^{-1} à 10^{-2} , ce qui correspond à la fréquence de conjugaison, alors que les vecteurs de cointégration sont stabilisés avec une fréquence de 10^{-5} à 10^{-6} . De plus, possédant l'indépendance d'un plasmide Ti spécifique, ils peuvent être introduits dans tout hôte d'*Agrobacterium* contenant le plasmide Ti ou le plasmide Ri, pourvu que les fonctions *vir* soient présentes.

2-9 Intégration de l'ADN-T

Le mécanisme de recombinaison de l'ADN-T dans le génome de la plante implique plusieurs fonctions: ouverture et configuration de la chromatine, arrivée du brin intermédiaire, coupure au niveau des séquences cibles dans l'ADN de la plante et extension de la coupure avec une activité exonucléasique 5'-3', insertion de l'ADN-T, synthèse du brin complémentaire de l'ADN-T par les enzymes cellulaires et finalement le processus de réparation qui se met en place. Après la recombinaison, des phénomènes de réarrangement peuvent exister. Ainsi, l'insertion de nouvelles séquences de longueur variable, de délétions affectant aussi bien l'ADN-T que les séquences de l'ADN de plante aux jonctions avec l'ADN bactérien ont été mises en évidence.

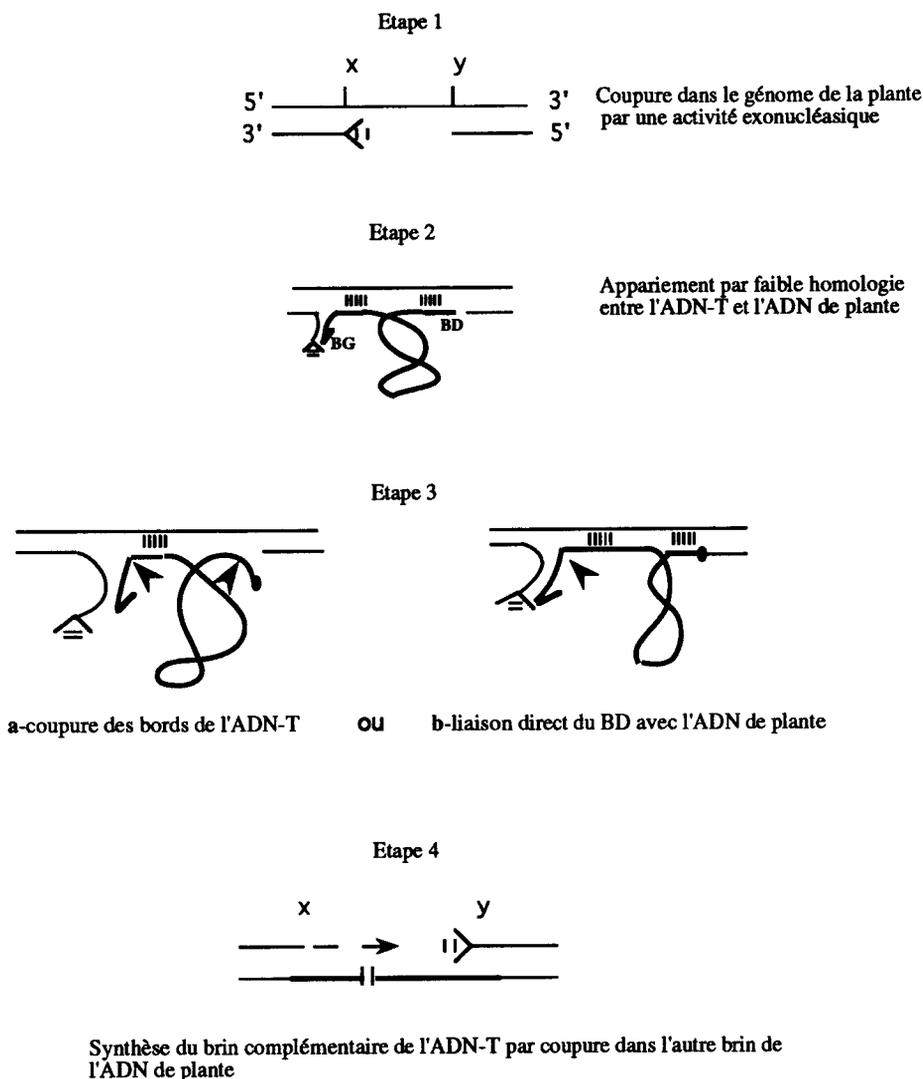
Plusieurs études ont été entreprises pour déterminer le nombre et la localisation des inserts de l'ADN-T. Une ou plusieurs molécules peuvent être transférées et intégrées dans le génome végétal (Thomashow *et al.*, 1980 ; Ursic *et al.*, 1983 ; Chyi *et al.*, 1986 ; Spielman et

Simpson, 1986 ; Jorgensen *et al.*, 1987). Ces copies sont parfois liées entre elles et parfois dispersées dans le génome de la plante. Les copies liées peuvent être en tandem ou orientées inversement (Chyi *et al.*, 1986 ; Jorgensen *et al.*, 1987).

Les séquences d'ADN de plusieurs jonctions ADN-T/ADN de plante ont été analysées (Simpson *et al.*, 1982 ; Yadav *et al.*, 1982 ; Zambryski *et al.*, 1989) et ont montré qu'en général, la jonction du côté du bord droit est plus précise que celle du bord gauche. L'extrémité droite du fragment intermédiaire obtenu dans *Agrobacterium* contient 3 bases du bord droit auxquelles la protéine Vir D2 se lie d'une façon covalente. L'extrémité gauche contient 22 bases du bord gauche et il n'y a pas de liaison protéique. Après insertion de l'ADN-T, l'analyse de la frontière droite à la jonction montre que le bord droit inclut toutes ou presque toutes les bases du fragment intermédiaire (Zambryski, 1989), alors que la frontière gauche de l'ADN-T après transfert perd assez souvent des séquences de l'extrémité gauche du fragment intermédiaire. Le nombre de bases perdues peut aller jusqu'à 100. Le site d'insertion avant et après l'intégration de l'ADN-T a été séquencé dans plusieurs espèces. Chez le tabac, l'insertion provoque la duplication de 158 pb de part et d'autre de l'ADN de la plante ainsi qu'une délétion, une translocation de plusieurs paires de bases (Gheysen *et al.*, 1987). Chez *Arabidopsis*, plusieurs événements d'intégration dans le génome ont été examinés (Matsumoto *et al.*, 1990). Les jonctions gauches entre l'ADN-T/ADN de plante montrent plus d'altérations que les jonctions droites. De même des délétions de plusieurs paires de bases (7 à 100 pb) sont mis en évidence à l'extrémité gauche de l'ADN-T. Parfois de nouvelles séquences s'insèrent entre l'ADN-T et l'ADN de plante. Ces séquences sont assez souvent présentes (40% chez *Arabidopsis thaliana*) et elles varient de 3 à 44 nucléotides.

L'analyse des séquences nucléotidiques de l'ADN des plantes au niveau de la jonction, avant et après l'insertion de l'ADN-T, montre une faible similitude de séquence avec l'ADN-T. De même, chez le tabac, l'analyse des séquences cibles montre peu de similitudes avec les jonctions aux bordures des séquences de l'ADN-T (Matsumoto *et al.*, 1990) ce qui suggère que l'intégration implique un processus de recombinaison illégitime (Low, 1988).

Des indications montrent que l'ADN-T s'intègre préférentiellement dans des régions transcriptionnellement actives (Koncz *et al.*, 1989 ; Herman *et al.*, 1990). Ainsi les blessures des fragments de plante stimulent la prolifération des cellules, la synthèse de l'ADN et activent le système de réparation utile pour la recombinaison de l'ADN-T.



**Figure 7 : Modèle général de l'intégration
de l'ADN-T (d'après Gheysen *et al.*, 1991).**

Légende

- ADN de plante
- ▷ Activité exonucléasique 5'-3'
- ||||| Appariements
- et

 ADN-T
- BD de l'ADN-T avec Vir D2
- ▼ Coupure
- ▶ Synthèse de l'ADN

Étape 1: Coupure de l'ADN de plante et élargissement de l'ouverture par une activité 5'-3' exonucléasique

Étape 2: Invasion du simple brin de l'ADN-T dans la séquence cible au niveau de l'ADN de la plante.

Étape 3a: Coupure des extrémités de l'ADN-T et liaison au niveau de la cible.

Étape 3b: Le bord droit peut être lié à l'aide de la protéine Vir D2.

Étape 4: Synthèse du brin complémentaire de l'ADN à l'aide d'une coupure dans l'autre brin de l'ADN de plante suivi par un système de réparation.

Un modèle d'intégration de l'ADN-T, plus au moins général, a été proposé (Figure 7). Les différentes étapes de ce modèle ne sont pas exécutées strictement dans l'ordre indiqué. Il n'est pas à exclure que le bord gauche puisse d'abord s'intégrer avant que le bord droit ne soit lié à la séquence de l'ADN de plante. L'ADN-T tronqué résulte de l'homologie des parties internes (au lieu de celle des bords) (Figure 7 ; Etape 3a, 3b) aux séquences de l'ADN de plante. Cependant les délétions ne touchent pas uniquement les bords de l'ADN-T (Gheysen *et al.*, 1991).

Des variations de ce modèle ont été proposées. Elles concernent la présence des deux bords entiers ou bien l'un des bords est conservé, l'autre perdu (Deroles *et al.*, 1988), ou enfin les séquences ADN-T sont directement ou indirectement répétées (Jorgensen *et al.*, 1987).

3. Contrôle de l'expression d'un gène

Certaines constructions chimériques fonctionnelles utilisent des promoteurs qui proviennent des gènes de l'ADN-T (promoteur de la nopaline synthase "nos" ou de l'octopine synthase "ocs"). Le promoteur double TR 1'-2' de la mannopine synthase est largement utilisé. En effet, il peut contrôler en même temps deux séquences codantes disposées inversement ; en plus il est induit par des blessures et par des régulateurs de croissance (Langridge *et al.*, 1989). Parmi les promoteurs d'origine virale utilisés on peut citer le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou fleur, qui est constitutif (Odell *et al.*, 1985). Il a été utilisé dans d'innombrables constructions chimériques pour augmenter l'efficacité d'expression des gènes marqueurs et des gènes de sélection (Paszkowski *et al.*, 1984 ; Lloyd *et al.*, 1986 ; Ow *et al.*, 1986 ; Pietrzak *et al.*, 1986 ; Assad-Garcia *et al.*, 1992). Ce promoteur permet l'expression des gènes introduits dans différents organes de plantes transgéniques. Cependant, le caractère constitutif du 35S est discuté. En effet, le promoteur 35S contient deux domaines (A et B). Le domaine A contient le motif as-1, qui lorsqu'il est en interaction avec le facteur nucléaire ASF-1 (Lam *et al.*, 1989 ; Katagiri *et al.*, 1989), entraîne une expression prédominante dans l'apex racinaire alors que dans les autres cellules l'expression est faible (Benfey *et al.*, 1989). Le domaine B qui a été divisé en cinq sous-domaines (B1, B2, B3, B4, et B5), contient des séquences de régulation en *cis* qui déterminent chacune, une expression spécifique et différente en fonction du stade de développement chez le tabac (Benfey, 1989 ; Benfey et Chua, 1989). L'effet de ces séquences de régulation est additive et synergique (Benfey *et al.*, 1990).

Gène	Source	Hôte transgénique	Inducteur	Référence
<i>rbcS</i>	Pois	Tabac	lumière	Nagy <i>et al.</i> , 1985 Fluhr <i>et al.</i> , 1986
<i>rbcS</i>	Pois	Pétunia	lumière	Fluhr <i>et al.</i> , 1986
<i>rbcS</i>	<i>N. plum.</i> ,	<i>N. plum.</i> Pétunia Tabac	lumière	Poulsen <i>et al.</i> , 1986
<i>rbcS</i>	Soja	Pétunia	lumière	Shirley <i>et al.</i> , 1987
<i>cab</i>	Pois	Tabac	lumière	Simpson <i>et al.</i> , 1986
<i>cab</i>	Blé	Tabac	lumière	Nagy <i>et al.</i> , 1986 Nagy <i>et al.</i> , 1987
<i>cab</i>	<i>N. plum.</i>	Tabac	lumière	Castresana <i>et al.</i> , 1988
<i>Hse</i>	Maïs	Pétunia	chaleur	Rochester <i>et al.</i> , 1986
<i>Hse</i>	Soja	Tabac	chaleur	Baumann <i>et al.</i> , 1987 Strittmatter et Chua, 1987
<i>ADH</i>	Maïs	Tabac	anaérobiose	Ellis <i>et al.</i> , 1987
<i>Prot. inhibiteur</i>	P. de terre	Tabac	blessure	Sanchez-Serano <i>et al.</i> , 1987
<i>GBSS</i>	P. de terre Tabac <i>A. thal.</i>	P. de terre	sucre	van der Steege <i>et al.</i> , 1992
<i>DC8</i>	Carotte	Carotte	ABA	Goupil <i>et al.</i> , 1992
<i>RCH10</i>	Riz	Tabac	éliciteur fongique + blessure	Zhu <i>et al.</i> , 1993

Tableau 1: Effet de certains stimuli environnementaux sur l'expression des gènes

D'autres études montrent une régulation du 35S. En effet, chez le melon, l'analyse de l'expression du gène *uidA* placé derrière le 35S montre une expression préférentielle dans les tissus vasculaires et dans les jeunes tissus. L'expression change en fonction du stade de développement de la plante (Dong *et al.*, 1991). Dans le fruit de *Physalis ixocarpa*, l'expression du 35S-*uidA* montre une régulation qui dépend surtout de l'âge physiologique du fruit puisque l'expression est très importante dans les fruits jeunes alors qu'elle est inexistante dans le fruit mature (Assad-Garcia *et al.*, 1992).

A côté de ces promoteurs d'origine bactérienne ou virale, d'autres constructions chimériques sont placées derrière des promoteurs de plantes (promoteur de la petite sous-unité de la Ribulose-1,5 biphosphate carboxylase oxygenase ou du promoteur de la protéine antenne liants les chlorophylles a/b) dans le but d'étudier les séquences de régulation des gènes de plantes.

3-1 Régulation des gènes

Les plantes transgéniques constituent un outil intéressant pour étudier l'expression des gènes introduits. L'expression est étudiée en fonction des stimuli d'environnement, de la spécificité des tissus et des différents stades de développement de la plante. Ces paramètres ont permis d'identifier des séquences de régulation en *cis* à l'extrémité 5' ou 3' du promoteur, et des facteurs nucléaires qui sont codés par une autre région du génome. Ces facteurs protéiques agissent en *trans* ("Trans-acting factors"). Lorsqu'ils viennent se fixer sur les séquences régulatrices, ils modifient l'expression du gène dans le sens d'une augmentation ou d'une diminution de l'activité.

3-1-1 Gènes inductibles

Plusieurs stimuli environnementaux peuvent influencer l'expression des gènes. Ainsi, le tableau 1 montre que la lumière, des régulateurs de croissance, les blessures, des chocs thermiques, l'anaérobiose, les sucres et les éliciteurs fongiques combinés à des blessures peuvent être des facteurs modifiant l'expression. L'étude de ces facteurs a permis de mettre en évidence des séquences de régulation de certains gènes.

Gène	Plante	Hôte transgénique	Organe/tissu	Référence
<i>rbcS</i>	Pois	Tabac	Feuille	Nagy <i>et al.</i> , 1985 Fluhr <i>et al.</i> , 1986
<i>rbcS</i>	Pois	Pétunia	Feuille	Fluhr <i>et al.</i> , 1986
<i>rbcS</i>	<i>N. plumb.</i>	<i>N. plumb.</i> Pétunia Tabac	Feuille	Poulsen <i>et al.</i> , 1986
<i>cab</i>	Pois	Tabac	Feuille	Simpson <i>et al.</i> , 1986
<i>cab</i>	Blé	Tabac	Feuille	Lampa <i>et al.</i> , 1985
<i>Patatine</i>	P. de terre	P. de terre	Tubercule	Twels et Ooms, 1987
<i>leghem</i>	Soja	Lotus	Nodule	Jensen <i>et al.</i> , 1986
<i>glutenine</i>	Blé	Tabac	Graine	Colot <i>et al.</i> , 1987
<i>legumine</i>	Pois	Tabac	Graine	Ellis <i>et al.</i> , 1987
<i>ESPS</i>	Pétunia	Pétunia	Fleur	Benfey et Chua, 1989
<i>tua1</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis</i>	Pollen	Carpenter <i>et al.</i> , 1992
<i>Zm13</i>	Maïs	Maïs <i>Tradescantia</i>	Pollen	Hamilton <i>et al.</i> , 1992
<i>LAT52</i>	Tomate	Tabac	Pollen	Twel, 1992
<i>prolamin</i>	Riz	Tabac	Albumen	Zhou et Fan, 1993

Tableau 2: Expression de gènes dans des tissus spécifiques.

Les gènes (*cab*) de la protéine antenne liants les chlorophylles *a/b* constituent un des modèles utilisés dans l'étude de l'expression des gènes dans les plantes. Leur expression est régulée par la lumière et par la nature des tissus (Berry-Lowe *et al.*, 1982 ; Cashmore, 1983). "La dissection" du gène *cab AB80* du pois montre qu'un fragment de 247 pb de -347 à -100 est capable de conférer une réponse à la lumière. L'activité de la transcription est indépendante de l'orientation de la séquence, qu'elle soit combinée dans son orientation d'origine ou inversée (Simpson *et al.*, 1986). De même, le gène *cab-1* du blé a une séquence de 268 pb de -347 à -89 activatrice de l'expression (Nagy *et al.*, 1987). L'analyse du gène *cab-E* de *Nicotiana plumbaginifolia* indique la présence de deux séquences activatrices et d'une séquence inhibitrice de l'expression et d'un facteur nucléaire agissant en interaction avec le promoteur (Castresana *et al.*, 1988).

L'extrémité 3' du gène peut également être importante pour l'induction de l'expression des gènes ; un exemple a été rapporté montrant que la région terminale du gène d'un inhibiteur de la protéase de type II est responsable de l'expression du gène après une blessure (Stanchez-Serrano *et al.*, 1987 ; Thornburg *et al.*, 1987).

Il est clair que la qualité de la transcription est régulée par des séquences activatrices se trouvant soit à l'extrémité 5' soit aux deux extrémités, comme c'est le cas du gène d'un inhibiteur de la protéase de type II. Cependant, les facteurs impliqués dans le contrôle quantitatif du taux de transcription sont encore mal connus. De plus, comme le montre le tableau 1, d'autres facteurs modifiant l'expression des gènes ont été mis en évidence.

3-1-2 Expression des gènes spécifiques des tissus

Une reproduction fidèle de l'expression endogène des gènes a été trouvée chez les plantes transgéniques (Tableau 2). Chez le tabac transgénique, le gène *rbcS-3A* du pois (Fluhr *et al.*, 1986b), le gène *rbcS ss3.6* et le gène *cab AB80* du pois (Simpson *et al.*, 1986) ainsi le gène *cab-1* du blé (Lampa *et al.*, 1985) montrent une expression forte dans les feuilles, faible dans les tiges et non décelable dans les racines. Les gènes induits par la lumière s'expriment dans les tissus chlorophylliens. Chez les gènes qui codent pour les protéines impliquées dans la photosynthèse, les séquences induites par la lumière sont identiques à celles qui confèrent une expression spécifique dans les tissus.

Les gènes codant pour les protéines de réserve du grain de blé s'expriment spécifiquement dans le grain (Colot *et al.*, 1987). Cette régulation est indépendante de l'anatomie et du stade de développement de la graine par rapport à la plante mère (Sengupta *et al.*, 1985). L'expression peut être spécifique du type cellulaire. Ainsi chez le blé l'expression est détectée dans les cellules de l'albumen (Colot *et al.*, 1987).

L'expression peut être spécifique des feuilles, des tubercules, des nodules, des grains de pollen, des fleurs, des graines et des fruits (tableau 2).

4. Facteurs influençant l'expression des gènes

La transformation génétique des plantes peut conduire à l'insertion d'une ou plusieurs copies de l'ADN-T. Ces copies peuvent être entières, délétées, réarrangées ou inversement répétées, et l'insertion peut se faire en un ou plusieurs sites d'insertion dans le génome de la plante. Ces paramètres génétiques peuvent entraîner une forte variabilité de l'expression des gènes entre les différents transformants (Jones *et al.*, 1985 ; Eckes *et al.* 1986 ; Dean *et al.*, 1988 ; Last et Gray, 1990). En plus, l'activité des gènes de l'ADN-T peut être affectée par des séquences adjacentes de l'ADN de plante (effet de position), par méthylation des gènes de l'ADN-T ou par la structure de la chromatine. Cependant aucun de ces facteurs génétiques ne peut être la seule explication de cette variabilité de l'expression. Par ailleurs, il a été assez souvent noté qu'il n'y a pas de corrélation positive entre le taux d'expression et le nombre de copies de l'ADN-T insérées (Jones *et al.*, 1985 ; Jones *et al.*, 1987 ; Dean *et al.*, 1988 ; Weissing *et al.*, 1988 ; Last et Gray, 1990). Les plantes ayant un nombre élevé de copies montrent un taux d'expression faible du gène introduit dû généralement à la méthylation (Hobbs *et al.*, 1990 ; Meyer *et al.*, 1992). Les régions activement transcrites sont hypométhylées (Antequera et Bird, 1988) alors que l'ADN méthylé est faiblement transcrit (Linn *et al.*, 1990). La présence de plusieurs copies pourrait entraîner une perte de l'activité transcriptionnelle suivie d'une méthylation du promoteur. La méthylation touche les sites CpG et CpNpG en particulier dans le promoteur (Gruenbaum *et al.*, 1981).

D'autres facteurs peuvent être une source de méthylation. Un stress dû au milieu de culture peut provoquer une variation génétique et une induction de la méthylation de l'ADN (Brown, 1989 ; Müller *et al.*, 1990). De même les conditions de culture peuvent favoriser la méthylation des gènes introduits. LoSchiavo *et al.*, (1989) ont montré que l'auxine a un effet important sur le taux de méthylation de la m⁵C des cellules embryonnaires de la carotte. La

méthylation de l'ensemble des cytosines peut atteindre 15 à 70 %. De même chez le pétunia, Renckens *et al.* (1992) ont montré qu'une forte concentration d'auxine dans le milieu de culture, utilisé pour contre-sélectionner le gène *iaaH*, a favorisé la méthylation des gènes introduits. Ces changements de méthylation contribuent à l'apparition de variations somaclonales parmi les plantes transformées (Phillips *et al.*, 1990).

Les différences conformationnelles de la structure de la chromatine peuvent être responsables de l'inactivation des gènes introduits. Cette liaison a aussi été observée chez les cellules animales (Weintraub, 1985). La méthylation de l'ADN peut modifier la structure de la chromatine, la rendant insensible aux nucléases .

L'inactivation des gènes par méthylation est un processus réversible. La réversion des cytosines méthylées peut être spontanée et être reliée à un cycle activation/inactivation (Matzke *et al.*, 1989). Une réactivation spontanée est observée après croisement des plantes (Mittelsten *et al.*, 1991). La réactivation a été aussi assurée par un traitement à la 5-azacytidine (5-AZA) (Weber *et al.*, 1990 ; Zhu *et al.*, 1991 ; Bocharde *et al.*, 1992 ; Palmgren *et al.*, 1993). La 5-AZA est un analogue chimique de la m⁵C (Jones, 1985) et un inhibiteur des ADN méthyltransférases (Santi *et al.*, 1983).

5. Conclusion

Depuis 1982, date à laquelle ont été obtenus les premiers cals transgéniques, d'énormes progrès ont été réalisés et de nombreuses espèces ont pu être transformées avec plus ou moins de succès. A côté des méthodes indirectes dont le principal vecteur demeure *Agrobacterium tumefaciens*, les méthodes de transfert direct, telles que l'électroporation de protoplastes ou la biolistique, se sont développées et ont surtout été utilisées pour des essais de transformation d'espèces récalcitrantes et en particulier pour l'obtention des céréales transgéniques. Malgré les succès enregistrés, nous avons vu que l'un des paramètres essentiels n'est toujours pas maîtrisé à savoir l'insertion d'un gène transféré dirigée dans un locus particulier (transformation homologue). Le fait que l'insertion se fasse au hasard et que le nombre d'inserts ne soit pas contrôlable a pour conséquence qu'il faut souvent éliminer un nombre de transformants chez lesquels, ou bien le gène introduit ne s'exprime pas, ou bien des effets pléiotropiques résultent en l'apparition de transformants inintéressants. Si l'on veut donc dans l'avenir parler de génie

génétique, en éliminant une grande partie d'effets secondaires aléatoires, il reste donc encore bien des voies à explorer.

Un autre aspect non encore maîtrisé concerne l'acquisition de la compétence à la transformation génétique par certaines cellules végétales. Quelques rares travaux (Sangwan *et al.*, 1992) posent le problème et ouvrent la voie à de nombreuses interrogations, plus qu'ils ne permettent de répondre à des questions telles que:

1- Dans quel état physiologique doit se trouver une cellule pour pouvoir être transformé? Faut-il, par exemple, qu'elle soit engagée dans une voie de dédifférenciation. Dans ce cas, pourquoi les cellules ayant conservé des caractéristiques méristématiques sont-elles plus difficiles à transformer ?

2- Existe-t-il des sites spécifiques de liaison des agrobactéries; quelle en serait leur nature ? Les protéines de surface, tels que le type vitronectine sont-elles des candidats sérieux de la liaison ? Faut-il au contraire rechercher du côté de macromolécules spécifiques polypeptidiques et/ou polysaccharidiques dont la synthèse serait induite par les agrobactéries?

Il semble dès lors évident que des recherches de type fondamental sont encore nécessaires pour comprendre les différents mécanismes d'interaction plante-bactéries intervenant lors d'une transformation génétique.

MATERIELS ET METHODES

Tableau 3

Composition des milieux d'induction du bourgeonnement sur les explants de racine tubérisées (H5), d'enracinements des bourgeons (H10) et de germination des graines (H20)

Macroéléments Concentration en (mg.l⁻¹)

CaCl ₂ , 2H ₂ O	75
MgSO ₄ , 7H ₂ O	250
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	125
NaNO ₃	600
KCl	750
Fe-EDTA : FeSO ₄ , 7H ₂ O	19,5
Na ₂ EDTA	1

Microéléments

ZnSO ₄ , 7H ₂ O	1
MnSO ₄ , 4H ₂ O	0,1
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,03
AlCl ₃	0,03
NiCl ₂ , 6H ₂ O	0,03
KI	0,01

Saccharose : 5g.l⁻¹ pour **H5**

10g.l⁻¹ pour **H10**

20g.l⁻¹ pour **H20**

pH : 5,6

Agar : 5g.l⁻¹

1. Le matériel végétal

Ce travail a été effectué sur *Cichorium intybus* L. var. Witloof cultivar Flash. Le matériel a été mis à notre disposition par Ets. Hoquet "Graines".

La conservation des racines récoltées à l'automne se fait en chambre froide à 4°C et celle des akènes au congélateur à -20°C.

2. Aseptisation

Les racines matures sont épluchées, stérilisées par une solution d'hypochlorite de calcium à 60 g.l⁻¹ pendant 30 min, puis rincées par trois bains successifs d'eau stérile pendant 10 min.

Les akènes sont désinfectés pendant 20 min par une solution de chlorure mercurique à 1%. Ils sont ensuite rincés à l'eau stérile trois fois pendant 5, 10 et 20 min respectivement.

3. Mise en culture

3-1 des explants racinaires

Après aseptisation, des fragments de 6 mm de diamètre sont découpés à l'aide d'un emporte-pièce dans la partie médiane de la racine, au niveau de l'assise cambiale. Ils sont ensuite débités en tronçons de 2 mm d'épaisseur puis sont mis en culture sur un milieu gélosé (H5) (Tableau 3) contenant les éléments minéraux du milieu de Heller (Heller, 1953). La régénération des bourgeons a lieu en présence de 16 h de lumière, la température des pièces de culture étant de 24° ± 2°C le jour et 20° ± 2°C la nuit.

3-2 des explants foliaires

Les akènes aseptisés sont mis à germer sur un milieu H20 (Tableau 3) pendant 48h et sont ensuite repiqués et mis en culture sur le même milieu pendant 21 jours pour assurer leur développement. Les conditions de température et de lumière sont les mêmes que pour les explants racinaires

Tableau 4

Composition du milieu de base pour l'induction du bourgeonnement sur les explants foliaires et cotylédonaire

<u>Macroéléments</u>	Concentration en (mg.l ⁻¹)
CaCl ₂ , 2H ₂ O	440
MgSO ₄ , 7H ₂ O	185
KH ₂ PO ₄	85
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
FeSO ₄ , 7H ₂ O	19,5
Na ₂ EDTA	1

Microéléments : les mêmes que pour le milieu de Heller

Vitamines : voir tableau 3

Saccharose	10.10 ³
Glutamine	150
Agar	5g.l ⁻¹
pH : 5,6	

Substances de croissance variables selon le milieu :

M2 = BAP : 0,1 mg. l⁻¹

M'2 = BAP : ,01mg.l⁻¹

2,4-D : 0,1 mg. l⁻¹

Les feuilles prélevées sur les plantules sont blessées par des incisions au niveau du limbe pour augmenter les surfaces réactionnelles et mises en culture sur un milieu de MS (Muraschige et Skoog, 1962) gélosé contenant $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP (M'2) (Tableau 4).

3-3 des explants cotylédonaire

Les graines germées sont repiquées sur le milieu H20 et sont mises en culture à l'obscurité pendant 5 jours. Les cotylédons étiolés sont incisés et mis en culture sur le milieu M'2.

4. Enracinement des bourgeons

Les bourgeons formés sur les différents explants de la chicorée sont excisés et mis sur un milieu d'induction de racines. Le milieu de Heller contenant 10 g.l^{-1} de saccharose (H10, Tableau 3) est utilisé comme milieu de base pour l'enracinement.

Dans le but d'augmenter le pourcentage d'enracinement, la proline à 100 mg.l^{-1} , une double concentration de nitrate et du NAM à $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ sont ajoutés séparément à ce milieu de base et sont testés pour améliorer l'enracinement des bourgeons.

5. Test de sensibilité à la kanamycine

Le gène de résistance à la kanamycine (*nptII*) est utilisé comme marqueur de sélection. Il permet de cribler les cellules transformées.

Afin de déterminer la concentration de kanamycine pour laquelle aucun bourgeon ne se forme, une gamme de kanamycine allant de 0 à 150 mg.l^{-1} a été employée pour les trois types d'explants utilisés pour la transformation.

6. Les souches d'*Agrobacterium tumefaciens*

Trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* sont utilisées pour la transformation de la chicorée. Chaque souche se différencie des autres par la nature du plasmide qu'elle possède.

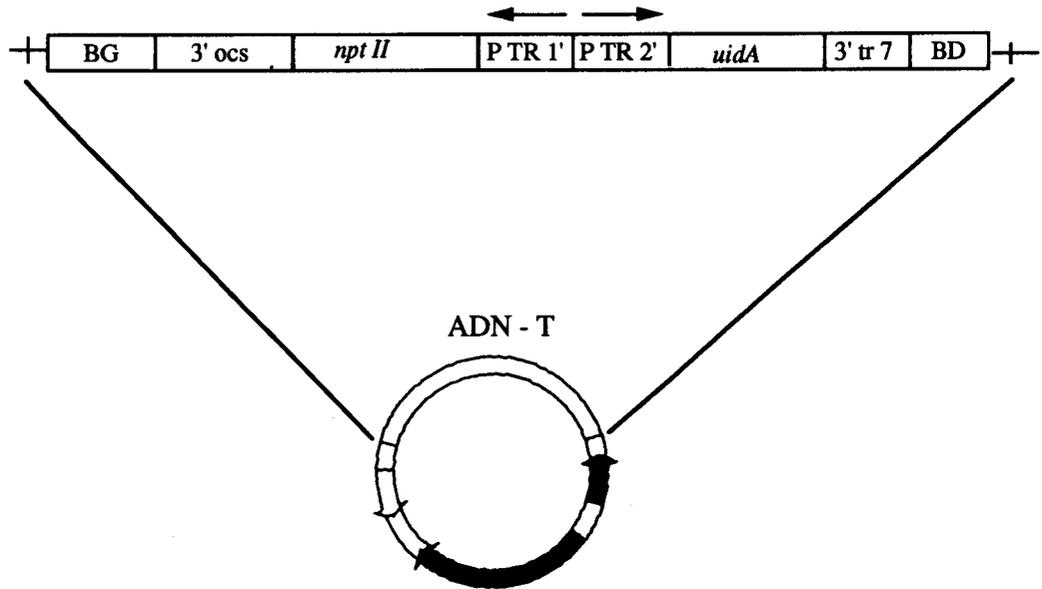


Figure 8A : Représentation schématique de l'ADN-T de la souche pGSGLOC1

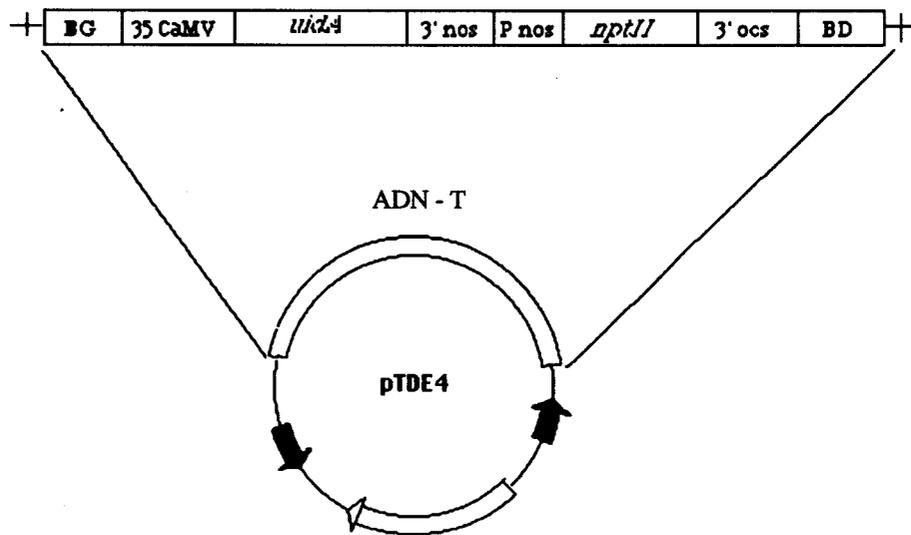


Figure 8B : Représentation schématique de l'ADN-T de la souche pTDE4

- nptII* : gène de la néomycine phosphotransférase II
- uidA* : gène de la β -glucuronidase
- pTR1' et pTR2' : promoteur double 1', 2' de la mannopine synthase
- pnos : promoteur de la nopaline synthase
- 35SCaMV : promoteur 35 S du virus de la mosaïque du chou-fleur
- 3' ocs : région 3' du gène de l'octopine synthase.
- 3' nos : région 3' du gène de la nopaline synthase.
- 3' tr 7 : région 3' du gène 7.
- BD : bord droit
- BG : bord gauche

- **pGSGLUC1** : Elle contient un vecteur binaire dérivant de la souche C58 d'*Agrobacterium tumefaciens* et possédant le plasmide pTiB6S3. Son ADN-T délété, il donne le plasmide Ti 2260 (plasmide de virulence) (Deblaere *et al.*, 1985). A ce plasmide est associé un plasmide dérivant du plasmide pTi941. Il possède entre les bordures de son ADN-T le gène de la néomycine phosphotransférase (gène *nptII*) conférant la résistance à la kanamycine, et le gène de la β -glucuronidase (gène *uidA*) qui est un marqueur de la transformation. Ces deux gènes se trouvent sous le contrôle du promoteur double TR1'2' de la mannopine synthase (Figure 8A).

- **pTDE4** : Elle comporte également un vecteur binaire. Elle contient le plasmide pGV2260. L'ADN-T de cette souche contient les mêmes gènes que l'ADN-T de la construction pGSGLUC1 mais sous le contrôle de promoteurs différents. Le gène *uidA* est sous le contrôle du promoteur du Virus de la Mosaïque du Chou-fleur (CaMV 35S) et le gène *nptII* sous le contrôle du promoteur nos de la nopaline synthase (Figure 8B).

L'intérêt d'utiliser ces deux constructions est de comparer l'expression du gène *uidA* sous les promoteurs TR et 35S CaMV dans les différents tissus et organes de la chicorée.

Afin de localiser les cellules infectées de l'explant végétal et de déterminer l'efficacité de transformation des tissus, nous avons utilisé une troisième souche d'*Agrobacterium tumefaciens*. Cette souche d'*Agrobacterium* contient un vecteur binaire. C'est la souche **LBA4404** (Hoekema *et al.*, 1983) possédant un plasmide pVDH124 (Figure 8C) portant sur son ADN-T les mêmes gènes marqueur et de sélection, sous les mêmes promoteurs que dans la construction pTDE4 si ce n'est que la séquence codante du gène de la β -glucuronidase contient un intron (Vancanneyt *et al.*, 1990). L'ARN provenant de ce gène chimérique ne peut être épissé et donc exprimé dans les bactéries.

7. Préparation des bactéries

Les agrobactéries utilisées pour la transformation sont conservées à 4°C pendant un mois sur un milieu YEB gélosé (Van Larebeke *et al.*, 1977) avec les antibiotiques adéquats pour maintenir la stabilité des souches ou sont conservées à -80°C dans le glycérol (un volume de suspension bactérienne pour un volume de glycérol).

Une colonie bactérienne est inoculée dans un erlen meyer stérile contenant 10 ml de milieu YEB liquide comprenant les antibiotiques suivants: rifampicine 100 mg.l⁻¹,

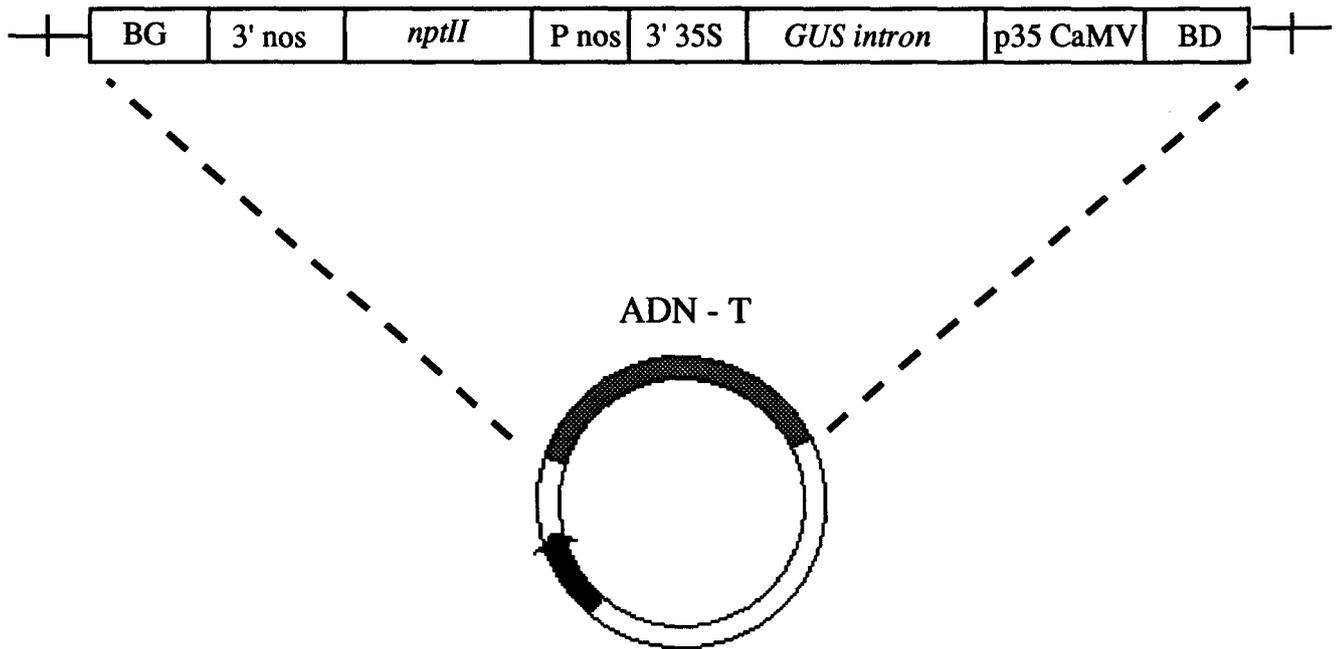


Figure 8C : Représentation schématique de l'ADN-T de la souche pVD1124.

nptII : gène de la néomycine phosphotransférase II

GUS intron : gène de la β -glucuronidase avec un intron

p35 S CaMV : promoteur 35 S du virus de la mosaïque du chou-fleur

pnos : promoteur de la nopaline synthase

3' nos : région 3' du gène de la nopaline synthase.

3' 35S : région 3' du gène du virus de la mosaïque du chou-fleur

BD : bord droit

BG : bord gauche

spectinomycine 100 mg.l^{-1} , streptomycine 300 mg.l^{-1} , triacilline 100 mg.l^{-1} . Les bactéries sont placées à 28°C pendant une nuit (16 h) dans un incubateur avec une vitesse d'agitation de 200 rpm. Quand la valeur de la densité optique (DO) de la suspension bactérienne à 600 nm est voisine de 1, les bactéries sont centrifugées pendant 15 min à 5000 rpm. Le culot bactérien est lavé avec une solution de MgSO_4 1mM et resuspendu dans 10 ml de milieu MS ou H5 liquide, constituant la suspension d'inoculation des explants.

8. Infection des explants

8-1 Les explants racinaires

L'infection des explants racinaires a été réalisée uniquement par les constructions pGSGLUC1 et pTDE4. Plusieurs conditions d'infection ont été utilisées pour ce matériel. Les explants sont soit directement mis dans une solution contenant la culture bactérienne (1 ml de suspension bactérienne dans 9 ml de milieu H5 liquide), soit mis dans la même solution à laquelle sont ajoutées différentes concentrations d'acétosyringone (20, 50, 75 et $100 \mu\text{M}$). Dans les deux cas, la coinfection dure 20 min. Les explants sont parfois enduits par des bactéries prélevées directement sur une boîte de Pétri.

Après la coinfection, les explants sont légèrement séchés avec du papier filtre stérile et mis en coculture sous une faible intensité lumineuse ($9 \mu\text{mole. (m}^2\text{)}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Les explants "enduits" restent "tartinés". Une coculture en milieu H5 liquide a également été essayée. Dans tous les cas la coculture dure 48 h

Après 2 jours de coculture, les explants sont lavés avec du milieu H5 liquide contenant $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de céfotaxime. Les explants sont ensuite séchés sur du papier filtre stérile et mis sur le milieu de sélection. La culture se fait à 24°C à une intensité lumineuse de $14 \mu\text{mole. (m}^2\text{)}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (tubes cool White) avec une photopériode de 16 h de lumière et de 8 h d'obscurité. Les bourgeons obtenus sont ensuite repiqués sur le milieu d'enracinement contenant la kanamycine.

Lorsque la pousse a formé quelques racines, elle est prélevée et transférée dans la tourbe humide. Afin d'acclimater les plantules, elles sont maintenues 1 à 2 semaines à $22^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. Les jeunes plantes sont ensuite placées dans des pots contenant du terreau et sont transférées en serre.

8-2 Les explants foliaires et cotylédonaires

Pour les cotylédons étiolés et les feuilles, l'infection se fait sur le milieu M'2 liquide contenant 100 μM d'acétosyringone. Après 20 min d'inoculation, les explants sont séchés sur du papier filtre stérile et mis en coculture sur le milieu M'2. Les conditions de coculture sont identiques à celles des explants racinaires. Après 48 h de coculture, les explants sont lavés dans le milieu M'2 contenant 250 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de céfotaxime, séchés sur papier filtre stérile et placés sur le milieu de sélection.

Les bourgeons qui se différencient au bout de 2 à 3 semaines de sélection sont repiqués sur le milieu d'enracinement en présence de kanamycine.

L'effet d'une préculture de 3 jours a été testé sur les explants foliaires et cotylédonaires. La préculture est faite sur un milieu qui induit la callogenèse. Les explants dilacérés sont mis sur le milieu M'2 additionné de 0,1 mg. l⁻¹ de 2,4-D. Une cicatrisation apparaît au niveau des blessures au bout de 72 h de préculture. Après 48 h de coculture, une sélection avec la concentration létale de kanamycine a été directement effectuée afin d'éviter le phénomène d'échappement qui pourrait être engendré par la prolifération du cal.

9. Adhésion bactérienne

L'adhésion des bactéries sur un support dépend à la fois des propriétés de surface du tissu et des bactéries. Fréquemment, l'étape d'adhésion ne constitue que l'étape préliminaire avant la multiplication et la colonisation à la surface cellulaire. Cette étape est nécessaire à l'infection des plantes par *Agrobacterium tumefaciens*.

L'attachement des bactéries aux explants a été analysé sur les tissus foliaires, cotylédonaires et racinaires, avec ou sans préculture de 3 jours. Ces explants sont infectés par la suspension bactérienne (préparée comme indiqué dans le paragraphe 5). Après 48 h de coculture les explants sont rincés avec du tampon cacodylate 0,1M pH 7,2 par agitation manuelle pendant 20 s. Les bactéries faiblement adhérentes et non adhérentes sont détachées au cours de ce traitement, et les bactéries encore attachées après ce rinçage sont considérées comme fermement attachées.

Les explants racinaires, foliaires et cotylédonaire avec ou sans préculture, portant les bactéries attachées, sont immergés successivement dans les solutions suivantes:

<u>Traitement</u>	<u>Temps d'incubation</u>
<u>1er jour</u>	
- pré-fixation dans 0,5% de glutaraldéhyde dans un tampon cacodylate 0,1M, pH 7,2 + 0,05% de rouge de ruthénium	30 min
- 5 lavages par de la glutaraldéhyde dans le tampon cacodylate + 0.05% de rouge de ruthénium	2h / bain
- lavage dans le tampon cacodylate	30 min
<u>2ème jour</u>	
- post-fixation dans une solution de tétr oxyde d'osmium à 2% dans le tampon cacodylate	2h
- 5 lavages dans le tampon cacodylate	30 min / bain
- 1% de thiocarbohydrazide	30 min
- 6 lavages à l'eau distillée	15 min / bain
- 1% de tétr oxyde d'osmium	2h30
- 6 lavages à l'eau distillée	15 min / bain
<u>3ème jour</u>	
- thiocarbohydrazine 1%	30 min
- 6 lavages à l'eau distillée	15 min / bain
- 1% tétr oxyde d'osmium	2h30
- 6 lavages à l'eau distillée	15 min / bain
- déshydratations successives par de l'éthanol à 10, 20, 30, 50, 70, 80, 95, 100% (2 fois)	30 min / bain

Les échantillons peuvent être conservés dans l'éthanol absolu avant d'être coupés en fragment de 1 cm et collés sur des pontons pour subir une déshydratation jusqu'au point critique puis une métallisation or/ palladium.

Tableau 5 : Préparation d'échantillons pour la microscopie à balayage

Les échantillons ont été préparés suivant la méthode de McCowan *et al.* (1978) (Tableau 5). Les observations sont effectuées au microscope électronique par balayage en collaboration avec J.P. Tissier du laboratoire INRA de Villeneuve d'Ascq.

Afin d'observer les points d'ancrage des bactéries aux cellules, des coupes ont été préparées sur les précédents explants et leurs observations ont été réalisées en microscopie électronique à transmission en collaboration avec C. Sloniami de l'unité 42 de l'INSERM à Villeneuve d'Ascq.

10. Détection de la vitronectine dans les tissus de la chicorée

La participation de protéines membranaires dans l'attachement d'*Agrobacterium* a été démontrée sur les racines de pois (Smith *et al.*, 1992). Récemment, la vitronectine, protéine de surface a été détectée chez plusieurs espèces de plantes et selon certains auteurs (Wagner et Matthyse, 1992), elle serait impliquée dans l'attachement d'*Agrobacterium* aux cellules végétales.

Nous avons examiné tout d'abord, si la vitronectine est présente dans les tissus de la chicorée.

Des fragments de feuilles, de cotylédons et de racines tubérisées sont fixés pendant 30 min à 4°C dans le tampon PBS pH 7,0 contenant de la paraformaldéhyde à 4% et de la glutaraldéhyde à 0,1%. Ces fragments sont ensuite lavés dans le PBS et conservés à 4°C pendant une nuit dans une solution de saccharose à 2,3 M et du PVP à 20%. Les échantillons à examiner sont lavés dans le PBS avec de l'ovalbumine (PBSO) afin de saturer les sites.

Ensuite les fragments de feuilles, de cotylédons et de racines tubérisées sont incubés pendant 30 min à 37°C en présence d'un anticorps primaire: anticorps monoclonal anti-vitronectine de souris (Monoclonal anti-vitronectine. Mouse Ascites Fluid Clone VIT-2, Sigma) dilué au 1/100. Les échantillons sont lavés 5 x 5 min dans le PBSO et sont incubés en présence d'anticorps anti-souris marqués à la fluorescéine (Zymed) dilués au 1/100, en présence du bleu d'Evans dilué au 1/1000 afin de réduire le bruit de fond. Après 30 min d'incubation à 37°C, les échantillons sont lavés 5 x 5 min dans le PBSO. Une observation au microscope à fluorescence est effectuée afin de déterminer la localisation de la vitronectine dans les différents tissus de la chicorée.

11. Analyse histochimique

11-1 Test GUS

La β -glucuronidase catalyse l'hydrolyse des β -glucuronides. Cette hydrolyse n'est pas spécifique des aglycones (Stoeber, 1961) et donc plusieurs substrats donnant des colorations différentes peuvent être utilisés par l'enzyme. Les produits obtenus précipitent à l'endroit de la réaction enzymatique ce qui permet de détecter l'activité GUS *in situ* et donc de localiser l'expression du gène *uidA* dans différents organes et à différents stades de développement des plantes transformées. Ce test histochimique est fait selon le protocole de Jefferson *et al.* (1987).

Les tissus fraîchement coupés sont immergés dans le tampon phosphate 50 mM pH 7,4 contenant le substrat 5-bromo 4-chloro 3-indolyl- β acide glucuronique (X-GLUC; Biosynth, Suisse) à 1 mM. Ils sont ensuite incubés à 37°C pendant une nuit. La β -glucuronidase catalyse le X-GLUC et suite à cette réaction, un précipité bleu se dépose au niveau du site d'activité de l'enzyme. Après l'incubation, en vue de favoriser l'analyse, les tissus sont débarrassés des pigments chlorophylliens par trois trempages dans de l'éthanol à 70%.

L'activité GUS a aussi été mesurée par fluorimétrie. Ce test est très sensible et permet une bonne quantification de l'activité de la β -glucuronidase. Le substrat 4-méthylumbelliferyl glucuronide (MUG), quand il est clivé par la β -glucuronidase, libère un produit fluorescent: 4-méthyl umbellifère (MU) (Jefferson, 1987). Les protéines sont extraites de feuilles ou de racines de plantes transformées et non transformées à l'aide de 150 μ l de tampon d'extraction (NaH₂PO₄ 50 mM pH 7, β -mercaptoéthanol 10 mM, EDTA 10 mM, N-lauroylsarcosine 0,1%, Triton X-100 0,1%). A 100 μ l d'extrait protéique sont ajoutés 500 μ l de MUG 1 mM dissous dans le tampon d'extraction. Le mélange est incubé à 37°C, et une aliquote de 100 μ l est prélevée au temps T₀ et à des intervalles de temps de 30, 60 et 120 min. La réaction est stoppée par l'addition de 0,9 ml de Na₂CO₃ 0,2 M. L'adjonction de Na₂CO₃ stoppe la réaction enzymatique et développe la fluorescence de la MU. La fluorescence est mesurée avec une excitation à 365 nm et à une émission à 455 nm dans un fluorimètre HITACHI. Le fluorimètre est calibré avec le standard MU à 0,1 μ M et à 1 μ M dans du 0,2 M Na₂CO₃. La concentration des protéines dans l'extrait est mesurée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) (Bio-Rad laboratories) et exprimée en mg équivalents de serum albumine bovine.

11-2 Confection des coupes

Après incubation dans le X-GLUC, les tissus sont rincés dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7 puis fixés pendant 4h à température ambiante dans le même tampon contenant de la glutaraldéhyde à 1%. Les tissus sont ensuite déshydratés et inclus dans la résine LR White (London Resin White, Bio-Rad laboratories). La déshydratation se fait comme suit:

- éthanol 30% , 90 min
- éthanol 70% , 90 min
- éthanol 95%, 90 min
- mélange LR White / éthanol 95% (3v / 1v), 60 min
- deux bains de LRWhite pur, 60 min.

Les tissus déshydratés sont inclus dans des capsules remplies de résine qui sont placées dans une étuve à 60°C pendant 20 h. Des coupes de 2 µm sont faites à l'aide d'un microtome à couteaux de verre. Les coupes sont ensuite déposées sur une lame dans une goutte d'eau, et sont séchées à 60°C. Une goutte de Depex™, agent de montage, est rajoutée aux coupes. L'observation se fait sur un microscope à fond noir.

Les coupes des boutons floraux sont réalisées à partir d'inclusions à 6% d'agarose préparé dans de l'eau distillée stérile. En raison de la taille du bouton floral, des coupes d'une épaisseur de 100 µm sont effectuées au vibratome. Les échantillons sont directement récupérés dans le tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7 puis immergés dans le tampon de réaction. Après une nuit d'incubation à 37°C, les coupes sont blanchies par trempage dans l'éthanol comme décrit ci-dessus et sont observées à l'aide d'un microscope en lumière blanche.

12. Analyse biochimique

La néomycine phosphotransférase II ou NPTII est une enzyme codée par le transposon Tn5. Elle est capable de phosphoryler des antibiotiques aminoglycosidiques, comme la néomycine, la gentamycine, la G 418 et la kanamycine (Davies et Smith, 1987). La réaction de phosphorylation implique le transfert du gamma-phosphate de l'ATP sur la molécule de l'antibiotique. Cette addition de phosphate empêche l'interaction de l'antibiotique avec les ribosomes. Le gène *nptII* est utilisé comme marqueur de sélection des plantes transgéniques.

La présence de l'enzyme NPTII est mise en évidence par une phosphorylation *in situ* de la kanamycine avec du $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (Reiss *et al.*, 1984).

Des fragments de feuilles de plantes de chicorée transformées et non transformées sont testées pour l'activité NPTII selon ce protocole. Environ 100 mg de feuilles sont broyées dans environ 100µl de tampon d'extraction contenant du Tris-HCl 50 mM pH 6,8, du β-mercaptoéthanol 1%(v/v) et de la leupeptine 0,13 mg.ml⁻¹ ; l'homogénat est conservé à 0°C. Des quantités égales de protéines, mesurées par la technique de Bradford, sont séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide non dénaturant. Après équilibrage du gel dans le tampon de réaction, 30 ml de tampon de réaction maintenus à 45°C et contenant 1% (w/v) d'agarose, 100 mg.ml⁻¹ de kanamycine et 50 µCi γ³²P-ATP (activité spécifique: 3000 Ci/mmol), sont coulés directement sur le gel. Une feuille de papier filtre Whatman P81 est placée sur le gel d'agarose gélifié, le tout est incubé 30 min à température ambiante. Trois feuilles de papier filtre Whatman 3 MM, 3 cm d'épaisseur de papier Sopalin, une plaque de verre et un poids de 200 g sont placés sur le papier P81 pendant 3h afin de réaliser un transfert. Le papier P81 est ensuite lavé quatre fois pendant 15 min dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7 à 80°C, et exposé sur un film X-ray (Kodak X-OMAT) pour une autoradiographie qui est effectuée pendant une nuit à -70°C.

13. Analyse moléculaire des plantes transgéniques

13-1 Préparation de l'ADN génomique des plantes et transfert par southern sur une membrane de nylon

L'ADN génomique est isolé à partir de feuilles de plantes transformées et non transformées selon le protocole de Dellaporta *et al.* (1983). Après précipitation dans de l'éthanol absolu et centrifugation, le culot d'ADN est dessalé dans l'éthanol 70% puis resuspendu dans du TE (Tris pH 8, 10 mM et EDTA pH 8, 0,1 mM).

10 µg d'ADN sont digérés pendant 12h à 37°C dans un mélange de 5 mM de spermidine, en présence de 10 unités d'enzyme de restriction et de 3 µl de tampon de réaction complété à 30 µl par de l'eau distillée stérile .

Les plantes transformées par la souche pGSGLuc1 sont digérées par l'enzyme de restriction *Bcl* I. Une digestion par *Hin* dIII est choisie pour les plantes transformées par la souche pTDE4.

Les extraits digérés sont chargés sur un gel d'électrophorèse TAE (Tris HCl 40 mM ; acide acétique (glacial) ; EDTA 1 mM pH 8) contenant 0,8% d'agarose. La migration s'effectue pendant 30 V.

Le transfert de l'ADN se fait selon la technique de Southern (1975) sur une membrane de nylon hybond-N⁺ (Amersham). Après transfert, l'ADN est fixé sur la membrane par cuisson à 80°C pendant 2h.

13-2 Préparation d'ADN plasmidique et marquage des sondes

13-2-1 Extraction

Un grand volume (200 ml) de milieu LB (Extrait de levure 0,5% ; tryptone 1% ; NaCl 1% ; pH 7,5) est infecté d'une colonie bactérienne, en présence de 50 mg. l⁻¹ de l'antibiotique de sélection (Ampicilline). Après une nuit de culture à 37°C sous agitation à 150 tours / min, les bactéries sont récupérées par centrifugation à 5000g pendant 15 min à 4°C. La suite de l'extraction des plasmides est effectuée selon le protocole des colonnes échangeuses d'anions Qiagen. Divers tampons sont utilisés à cet effet. Les tampons P1 (50 mM Tris/HCl, 100 mM EDTA, pH 8, 100 µg.ml⁻¹ d'ARNase A) et P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) permettent de lyser les bactéries, de détruire les ARN et de dénaturer l'ADN génomique. Un tampon P3 (2,55 M KAc, pH 4,8) précipite les protéines et l'ADN génomique.

Après centrifugation, l'ADN plasmidique présent dans le surnageant est récupéré par élution d'une colonne Qiagen puis précipité à l'éthanol absolu pendant une nuit à -20°C. L'ADN plasmidique est resuspendu dans de l'eau stérile et aliquoté.

13-2-2 Digestion et électrophorèse

Les plasmides sont digérés, durant 2 h à 37°C, en présence d'enzymes de restriction à raison de 5 unités par µg d'ADN, de tampon de digestion spécifique à l'enzyme dans un volume final de 20 µl. A l'issue de la digestion, les fragments de restriction obtenus sont séparés par électrophorèse d'un gel d'agarose à faible point de fusion à 0,8% dans le TAE pendant 2 h à 60 volts ; le fragment d'ADN à isoler est découpé du gel et soumis à la purification.

13-2-3 Purification et quantification de l'ADN

L'ADN contenu dans l'agarose est purifié par une succession d'extractions au phénol et de centrifugations d'une durée de 30 min. L'ADN est précipité en présence de 1/10 de volume de chlorure de sodium 5 M et 2 volumes d'éthanol absolu pendant une nuit à -20°C. Après une centrifugation de 20 min à 10 000g à 4°C, l'ADN est resuspendu dans de l'eau stérile. La concentration est estimée sur boîte de Pétri contenant un gel d'agarose 1% supplémenté en Bromure d'Ethyidium (5 µg.ml⁻¹) avec une gamme connue d'ADN de phage lambda (Christen et Montalbano, 1988).

14. Marquage et purification des sondes

Un marquage radioactif des sondes au ³²P dCTP est réalisé selon le principe de la synthèse à amorce aléatoire décrit par Feinberg et Vogelstein (1983,1984). L'ADN polymérase T7 (Pharmacia LKB) permet cette synthèse en présence de 50 ng de matrice d'ADN dénaturé, de nonamères nucléotidiques servant d'amorces, de 50 µCi de α ³²P dCTP et de 300 mM de dATP, dCTP, dGTP et de dTTP non radioactifs. Pour ce marquage, 15 à 20 min de réaction enzymatique à 37°C suffisent. Les nucléotides non incorporés sont élués sur colonne d'affinité (Qiagen tip-5). La sonde purifiée est dénaturée à 100°C pendant 10 min. A l'aide d'un compteur à scintillation (Gamma), l'intensité du marquage est déterminée. L'intensité obtenue est généralement de l'ordre de 2000 cpm.

15. Hybridation

Une préhybridation de la membrane dure au moins deux heures à 42°C dans le tampon de préhybridation auquel on ajoute de l'ADN de sperme de hareng dénaturé (Tableau 6) qui permet la saturation des sites de la membrane. La préhybridation se fait dans un volume de 25 ml dans un four à hybridation (Techné). Les sondes radioactives correspondant aux séquences du gène *uidA* ou du gène *nptII* sont ajoutées séparément à 10 ml de tampon d'hybridation. L'hybridation est poursuivie durant une nuit à 42°C.

Le lendemain, la membrane est lavée 2 x 5 min dans du 2 x SSC contenant 0,1% de SDS à température ambiante et 1 h dans le même tampon à 65°C. Enfin elle est rincée dans du 2

x SSC, séchée entre deux papiers Whatman 3 MM et mise dans une cassette en plomb. On procède à une autoradiographie sur un film Kodak (X - OMAT) pendant une nuit à - 70°C.

Solutions	Tampon de préhybridation (25 ml)	Tampon d'hybridation (10 ml)
Formamide déionisée	12,25 ml	5 ml
20 x SSC	6,25 ml	2,5 ml
100 x Denhardt's	1,25 ml	0,1 ml
20% SDS	0,125 ml	0,1 ml
1 M tampon phosphate de sodium (pH 6,8)	1,25 ml	0,2 ml
Dextran sulfate (PM 500000)	-	1g
Eau stérile	3,885 ml	1 ml

Tableau 6 : Composition des tampons de préhybridation et d'hybridation.

16. Analyse de la génération F1

Les plantes transformées à l'aide des constructions pTDE4 et pGSGLUC1 sont mises à vernaliser pendant 2 mois à 4°C, puis sont placées en serre à 22°C pour la mise à fleur. Après 2 mois, des hampes florales se développent et des boutons floraux commencent à s'ouvrir. Les plantes sont fertiles et une autofécondation manuelle est effectuée pour obtenir la génération F1. Après un mois, les graines obtenues par autofécondation des plantes-mères sont stérilisées et mises à germer sur le milieu H2O. Au bout de 48 h, les graines germées sont transférées de nouveau sur le même milieu avec 50 µg.ml⁻¹ de kanamycine afin de sélectionner les transformants résistants de la génération F1.

Le test GUS est effectué sur des grains de pollen des boutons floraux jeunes (non ouverts) et des boutons floraux matures (ouverts) des plantes transformées et non transformées ainsi que sur les embryons des graines qui n'ont pas germé.

La chicorée étant une plante bisannuelle, les graines issues des croisements de seconde génération n'ont pu être analysées.

17. Transformation des protoplastes par électroporation

Les protoplastes sont des cellules végétales momentanément débarassées de leur paroi, ils sont sphériques et limités uniquement par le plasmalemme. Tout en conservant les potentialités des cellules végétales entières et en particulier leur capacité à régénérer des plantes, les protoplastes se prêtent à des manipulations d'ordre génétique pouvant contribuer à l'amélioration des espèces végétales ou à l'étude des séquences de régulation des gènes.

Au cours de notre travail, nous avons exploité les connaissances déjà acquises sur l'obtention, la culture et la régénération des protoplastes foliaires de *Cichorium intybus* L. var Witloof par Crépy *et al.* (1982), Saski *et al.* (1986), Wali Alami (1987) et Rambaud *et al.* (1990) pour tenter de déterminer les conditions permettant l'électroporation des protoplastes de la chicorée.

17-1 Le matériel végétal

Les graines de chicorée (*Cichorium intybus* L. var Witloof) désinfectées sont mises à germer sur le milieu de Heller gélosé contenant 20 g/l de saccharose (H2O). Les plantules sont cultivées en photopériode de 16h de lumière et de 8h d'obscurité et sous une intensité lumineuse de $14 \mu\text{mole} \cdot (\text{m}^2)^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ fournis par des tubes fluorescents de type "Deluxe cool white". Après 12 jours de culture, les feuilles sont lacérées au niveau de l'épiderme inférieur puis mises dans le milieu de macération PO (Saski *et al.*, 1986) (Tableau 5) en présence de cellulase (345L) et de pectinase (M2L) face lacérée contre le milieu. Après la macération à 30°C, les protoplastes sont ensuite filtrés sur un filtre sterile en acier inoxydable de 80 μm de vide de maille puis centrifugés pendant 10 min à 100 g. Le surnageant est éliminé à l'aide d'une pipette pasteur stérile alors que le culot est redissous dans le milieu PO puis recentrifugé pendant 10 min. L'opération est répétée 3 fois afin d'éliminer les enzymes dont la présence gênerait la reconstitution de la paroi et par conséquent la division. Au bout de la 3ème centrifugation, les protoplastes sont comptés dans une cellule de Nageotte. La concentration des protoplastes est ajustée à 10^6 protoplastes. ml^{-1} . Puis ils sont resuspendus dans un tube Falcon de 15 ml dans du milieu d'électroporation. Ils sont ensuite incubés pendant 5 min à 45°C puis mis sur glace. L'ADN du plasmide circulaire (issu de la construction pTDE4) et l'ADN entraîneur (ADN du sperme de hareng) sont ajoutés à la suspension de protoplastes dans un volume inférieur à 50 μl . Un volume de 800 μl de la suspension de protoplastes est placé dans une cuvette

d'électroporation (0,4 cm Bio-Rad) préalablement refroidie. La cuvette est mise dans l'électroporateur qui fournit des impulsions à décroissance exponentielle. Une décharge électrique est envoyée à une capacitance de 960 μF . La cuvette est remise sur glace pendant 10 min. Les protoplastes sont mis en culture à raison de 30.10^3 protoplastes.ml⁻¹ dans le milieu MC1 (Tableau 7).

17-2 Détermination des paramètres de survie des protoplastes

Afin d'avoir un nombre important de protoplastes, différentes durées de macération ont été utilisées. La concentration de cellulase a été réduite lors des macérations de longue durée (Tableau 8).

Durée de macération à 30°C	Enzymes
5h30	- 0,5 mg.ml ⁻¹ M2 - 3 mg.ml ⁻¹ 345L
16h	- 0,5 mg.ml ⁻¹ M2 - 1 mg.ml ⁻¹ 345L

Tableau 8 : Effets de la concentration en cellulase (345L) et de la durée de macération sur le rendement en protoplastes.

Une expérience initiale consiste à optimiser l'application du voltage afin d'obtenir des pourcentages élevés de protoplastes vivants. Des impulsions électriques d'intensité variant de 200 à 600V à une capacitance de 960 μF ont été testées sur les suspensions contenant 10^6 protoplastes.ml⁻¹ dans le milieu d'électroporation. Après électroporation, les protoplastes sont remis en culture à raison de 10^5 protoplastes dans 3 ml de milieu MC1.

La calcéine est utilisée comme sonde fluorescente pour l'étude de la perméabilisation des protoplastes électroporés à 300 V.

17-3 Survie des protoplastes après traitement électrique

Le pourcentage de protoplastes vivants est déterminé par observation directe sur microscope. Les protoplastes vivants sont repérés par :

- leur forme parfaitement sphérique
- un cytoplasme clair et réfringent

17-4 Concentrations du plasmide et de l'ADN entraîneur utilisées

Afin de trouver les conditions optimales de transfert d'ADN dans les protoplastes de chicorée, nous avons fait varier la concentration d'ADN plasmidique. Pour une densité de 10^6 protoplastes.ml⁻¹, nous avons utilisé des concentrations d'ADN plasmidique de 0, 25, 50 ou 75 µg. D'autre part, des électroporations ont été effectuées en présence ou en absence de 50 µg d'ADN entraîneur.

17-5 Test GUS

La détection de la β-glucuronidase dans les cellules est faite 24 h après électroporation selon le protocole de Jefferson *et al.* (1987) 16 h. Le nombre de protoplastes exprimant le gène *uidA* dans chaque boîte de Pétri (environ 10^5 protoplastes au total) est compté sous microscope 24 h après le test. L'efficacité de transformation est calculée en se basant sur le nombre de cellules montrant une activité GUS et rapportée au nombre total de protoplastes mis en culture.

RESULTATS

I. Aptitude de différents organes de la chicorée de Bruxelles à la culture *in vitro*

Avant d'entreprendre la transformation des tissus de la chicorée, nous avons confirmé les aptitudes à la régénération de cette plante en culture *in vitro*. Pour cela, nous nous sommes servi d'explants prélevés sur des racines tubérisées. Nous avons également étudié les conditions de régénération d'explants foliaires et cotylédonaire étiolés provenant de plantules cultivées en conditions aseptiques.

1. Mise en culture d'explants racinaires

1-1 Composition du milieu de culture

Depuis les travaux de Sene *et al.* (1983) et de Vasseur *et al.* (1986), on sait que chez la chicorée, l'orientation d'une voie de différenciation organogène dépend à la fois de la teneur en sucre et de celle en auxine du milieu de culture.

L'auxine et le sucre en forte concentration inhibent la différenciation de bourgeons et favorisent la rhizogenèse. L'auxine a donc été éliminée du milieu et une teneur de 5 g.l⁻¹ de saccharose a été utilisée dans le milieu de culture.

1-2 Zone de prélèvement d'explants

Des explants de 6 mm de diamètre et de 2 à 3 mm d'épaisseur sont prélevés au niveau de l'assise cambiale dans la moitié supérieure de la racine. Les explants sont mis sur le milieu H5 et placés en salle de culture à 24°C, avec une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité (planche 1A).

Après deux semaines de culture, des bourgeons apparaissent sur tous les explants (planche 1B) et on dénombre de 3 à 4 bourgeons par explant (Tableau 9). La qualité de ces bourgeons (vigueur, couleur, absence de vitrosité) est satisfaisante.

Nombre d'explants testés	Explants avec bourgeons	Fréquence de bourgeonnement (%)	Moyenne de bourgeons/explant
37	37	100%	4 ± 0,2

Tableau 9 : Fréquence de régénération de bourgeons à partir d'explants racinaires de *Cichorium intybus* L. var Witloof.

2. Mise en culture d'explants foliaires

2-1 Matériel de départ utilisé

Les graines de *Cichorium intybus* L. var Witloof sont mises à germer sur un milieu H2O pendant 3 jours.

Les jeunes plantules sont transplantées dans des tubes contenant le milieu H2O. Après 2 à 3 semaines de culture à une température de 24°C avec une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité, des plantules chlorophylliennes se développent (planche 1C) ; leurs feuilles sont utilisées pour la régénération des bourgeons.

2-2 Composition du milieu de culture

Les feuilles prélevées sur des plantules de 21 jours sont blessées par deux incisions perpendiculaires à la nervure principale, elles sont mises en culture sur le milieu M'2, qui contient les éléments de Murashige et Skoog (1962) (MS), les vitamines de Morel et Wetmore, du myo-inositol, du saccharose (10 g.l⁻¹), de la glutamine et une substance de croissance : l'adénine amino purine (BAP) à 0,1 mg.l⁻¹.

Après trois semaines de culture, les explants foliaires régénèrent des cals sur lesquelles apparaissent des bourgeons (planche 1D). La moyenne de bourgeons néoformés est de 10 (Tableau 10). Lorsque les bourgeons atteignent une taille de 0,5 à 2 cm, ils sont excisés et mis en culture sur un milieu d'enracinement.

Nombre d'explants testés	Explants avec cals	Explants avec bourgeons	Fréquence de bourgeonnement (%)	Moyenne de bourgeons/explant
45	45	45	100%	10 ± 0,45

Tableau 10 : Fréquence de régénération de bourgeons à partir d'explants foliaires de *Cichorium intybus* L.var Witloof.

3. Mise en culture d'explants cotylédonaire étiolés

Les plantules sont repiquées dans des tubes contenant le milieu H20 et sont mises en culture à l'obscurité pendant 5 jours. Les cotylédons étiolés (planche 1E) sont incisés et mis en culture sur le milieu M'2. Deux semaines plus tard 4 à 5 bourgeons (Tableau 11) apparaissent par explant au niveau de la blessure (planche 1F).

Nombre d'explants testés	Explants avec cals	Explants avec bourgeons	Fréquence de bourgeonnement (%)	Moyenne de bourgeons/explant
40	40	35	87,5%	5 ± 0,4

Tableau 11 : Fréquence de régénération des bourgeons à partir d'explants cotylédonaire étiolés de *Cichorium intybus* L. var Witloof.

4. Conclusion

Tous les tissus de la chicorée sont capables de différencier des bourgeons sur des milieux appropriés. La fréquence de régénération de pousses feuillées la plus élevée est obtenue sur des explants foliaires et racinaires. Par ailleurs, les explants foliaires produisent plus de bourgeons que les explants prélevés sur d'autres types tissulaires.

PLANCHE 1

Néoformation de bourgeons à partir d'explants racinaires, foliaires et cotylédonaire de *Cichorium intybus* L.

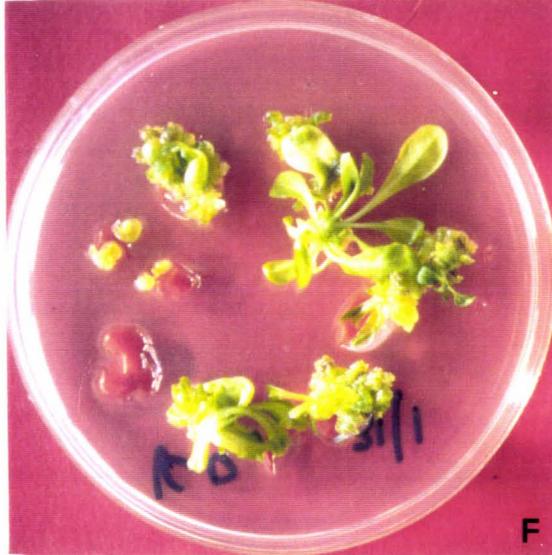
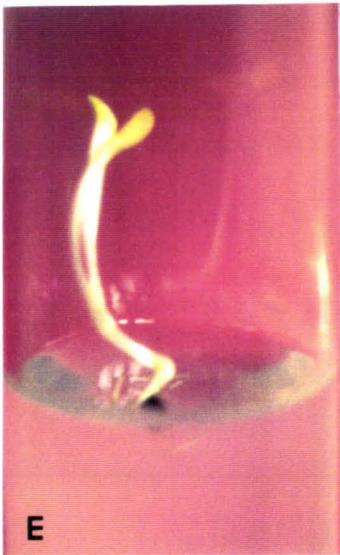
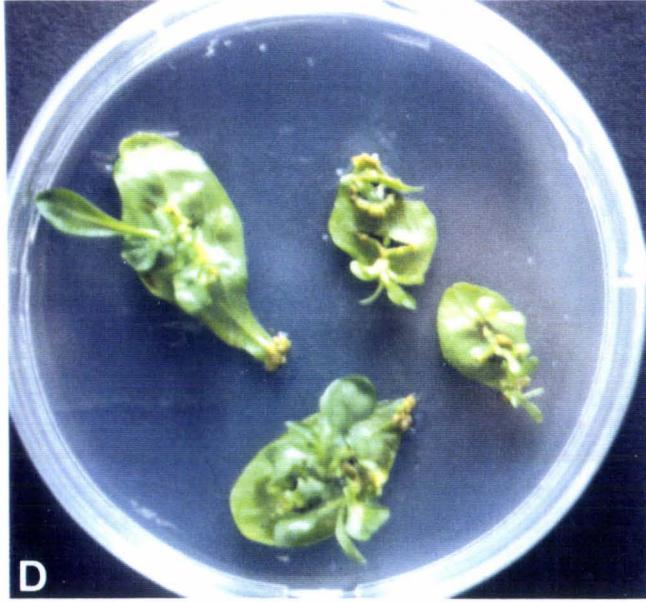
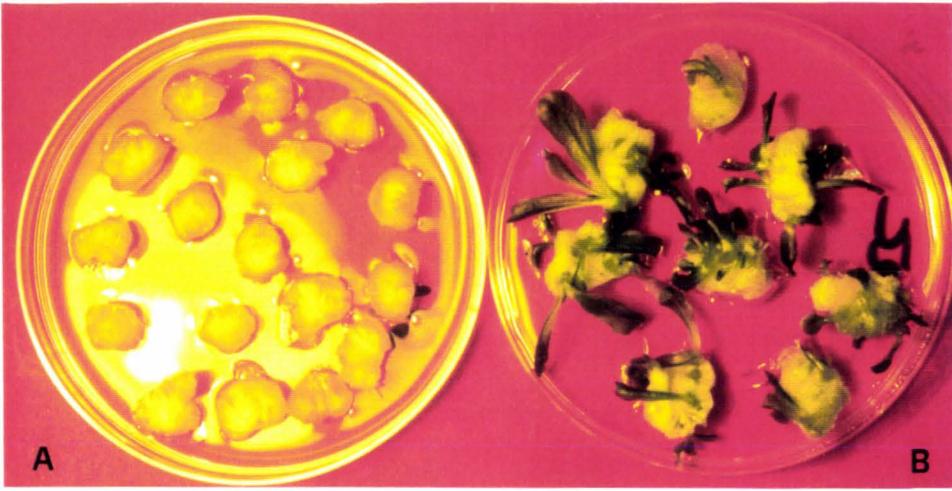
(A) : Explants racinaires mis en culture sur le milieu de régénération H5.

(B) : Production de pousses feuillées par les explants racinaires après trois semaines de culture.

Mise en culture des feuilles **(C)** et des cotylédons étiolés **(E)**.

Production de pousses feuillées par des explants foliaires **(D)** et par des explants cotylédonaire **(F)** après trois semaines de culture.

Planche 1



5. Enracinement des bourgeons

Pour induire l'enracinement des bourgeons, nous les avons placés sur le milieu base (H10, Heller à 10 g.l⁻¹ de saccharose) que nous avons varié pour améliorer l'enracinement.

- Des pousses feuillées ont été repiquées sur le milieu H10 contenant 100 mg.l⁻¹ de proline. Ce composé azoté semble être intéressant dans la différenciation rhizogène. En effet, dans cette condition, des racines filiformes se sont développées à la base de la pousse feuillée. L'union des faisceaux vasculaires du bourgeon à ceux de la racine semble être directe sans l'intermédiaire de cal.

- Par ailleurs, des travaux antérieurs, effectués au laboratoire ont montré que la formation des racines est augmentée en présence de nitrate. Ces travaux permettent de penser que la nitrate réductase pouvait être un marqueur de la rhizogenèse dans notre matériel (Dorchies et Rambour 1983, 1985). C'est pour cette raison que nous avons utilisé des milieux d'enracinement contenant une teneur en NO₃ double de celle utilisée habituellement. Une amélioration de l'enracinement sur un milieu de Heller, avec la double concentration de NaNO₃ a été observée sur les bourgeons comparée à l'enracinement des bourgeons témoin (Tableau 12).

- L'addition de naphtylacétamide (NAM) à 0,1 mg.l⁻¹ au milieu de Heller a permis d'obtenir 76% d'enracinement des pousses feuillées (Tableau 4). Le NAM est métabolisé par la chicorée à l'aide d'hydrolases aspécifiques (Vuylsteker *et al.*, 1992). Les plantes sont capables de transformer le NAM en acide naphtylacétique (ANA) qui est une molécule ayant des propriétés auxinomimétique ; cultivées en présence de 0,1 mg.l⁻¹ de NAM, les pousses néoformées différencient de nombreuses racines. Cependant un petit cal se développe à la base de la pousse mais cela ne nuit pas au développement de la plantule.

	n	% d'enracinement
100 mg. l ⁻¹ de proline	29	27,5
2 x NaNO ₃	25	36
0,1 mg. l ⁻¹ de NAM	33	76
H10	31	25

Tableau 12 : Effet de la proline, du NAM et d'une double concentration de nitrate sur l'enracinement des bourgeons après un mois de culture sur un milieu de base (H10, saccharose 10 g.l⁻¹).

n : nombre de bourgeons mis en culture.

Après avoir testé divers facteurs en vue d'améliorer l'enracinement, nous sommes parvenu grâce en utilisant du NAM à $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$, à provoquer l'enracinement de 76 % de bourgeons.

Les bourgeons qui ne se sont pas enracinés sont soit des bourgeons de taille réduite (0.5 cm) dont la croissance semble être arrêtée, soit des bourgeons vitreux.

6. Conclusion

Nous avons montré qu'à partir de racines tubérisées, de feuilles et de cotylédons de chicorée, il était possible de régénérer des bourgeons et de les enraciner facilement en présence du NAM. Notre travail de transformation pouvait donc commencer.

7. Test de sensibilité à la kanamycine

Nous avons à notre disposition trois types de tissus de chicorée : des racines tubérisées, des feuilles et des cotylédons. Il était alors indispensable, avant de commencer la transformation, de définir les doses létales de l'antibiotique à employer dans les milieux d'induction et de différenciation des bourgeons.

Pour cela, nous avons ajouté aux milieux de culture des concentrations croissantes de kanamycine. La kanamycine représente un marqueur de sélection fiable, qui est utilisé fréquemment dans des constructions de vecteurs servant à la transformation de très nombreuses plantes. C'est aussi un gène stable dans lequel aucune mutation spontanée n'a été jusqu'à présent rapportée.

La kanamycine a été introduite aseptiquement dans le milieu de culture maintenu à 45°C .

Une gamme de kanamycine : 0, 10, 20, 30, 50, 75, 100 et $150 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a été utilisée afin de déterminer la concentration létale.

Un autre antibiotique a été incorporé dans le milieu de culture : la céfotaxime (céfotaxime, Hoechst). La céfotaxime, agent bactériostatique, inhibe le développement des agrobactéries, et n'est toxique pour les végétaux qu'à de très fortes concentrations. Nous l'avons utilisé à une concentration de $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

7-1 Explants racinaires

Des fragments de 2 à 3 mm d'épaisseur sont prélevés au niveau de l'assise cambiale dans la moitié supérieure de la racine et sont mis en culture en présence de différentes concentrations de l'agent sélectif.

Les explants produisant des bourgeons sur du milieu H5 contenant différentes concentrations de kanamycine ont été comptés après trois semaines de culture. La figure 9 montre qu'à 75 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de kanamycine, la production de bourgeons par les explants racinaires est complètement inhibée. Cette concentration est alors utilisée pour la sélection des bourgeons transformés.

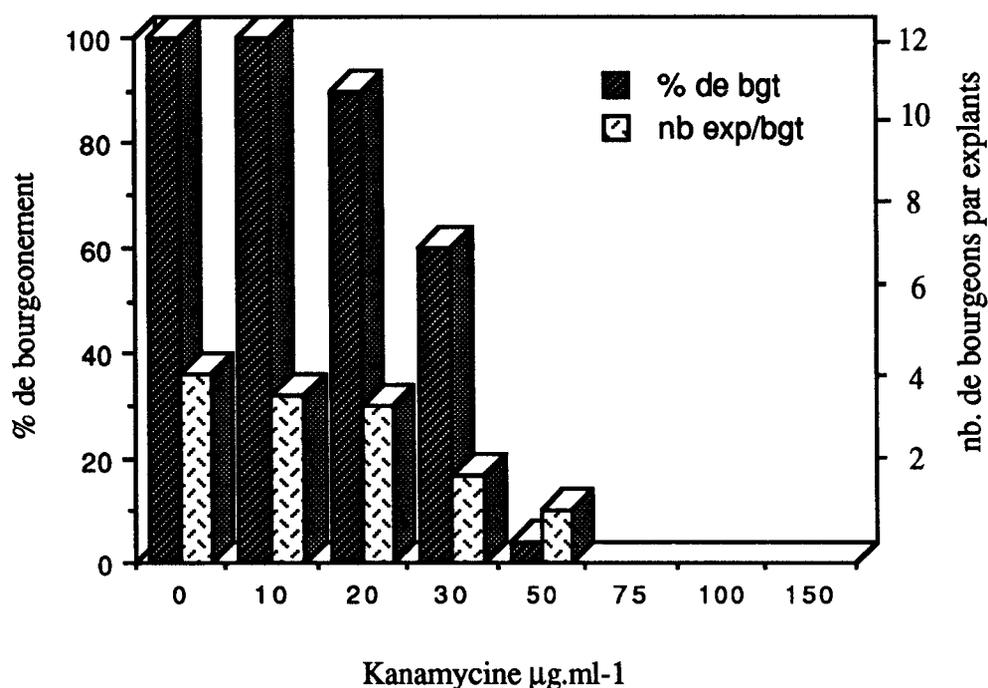


Figure 9 : Test de sensibilité à la kanamycine effectué sur des explants de racines tubérisées de *Cichorium intybus* L. var Witloof.

% de bgt : nombre d'explants régénérant des bourgeons sur le nombre total d'explants racinaires testés.

nb bg/ expl : nombre de bourgeons formés par explant racinaire.

7-2 Explants foliaires

Des explants foliaires ont été cultivés sur le milieu M'2 en présence des mêmes teneurs variables de kanamycine, afin de déterminer la concentration létale.

Après trois semaines de culture en présence des différentes concentrations de kanamycine, les cals et les bourgeons ont été dénombrés sur les explants foliaires.

La figure 10 montre qu'au delà de 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, l'explant foliaire se nécrose et ne forme aucun bourgeon.

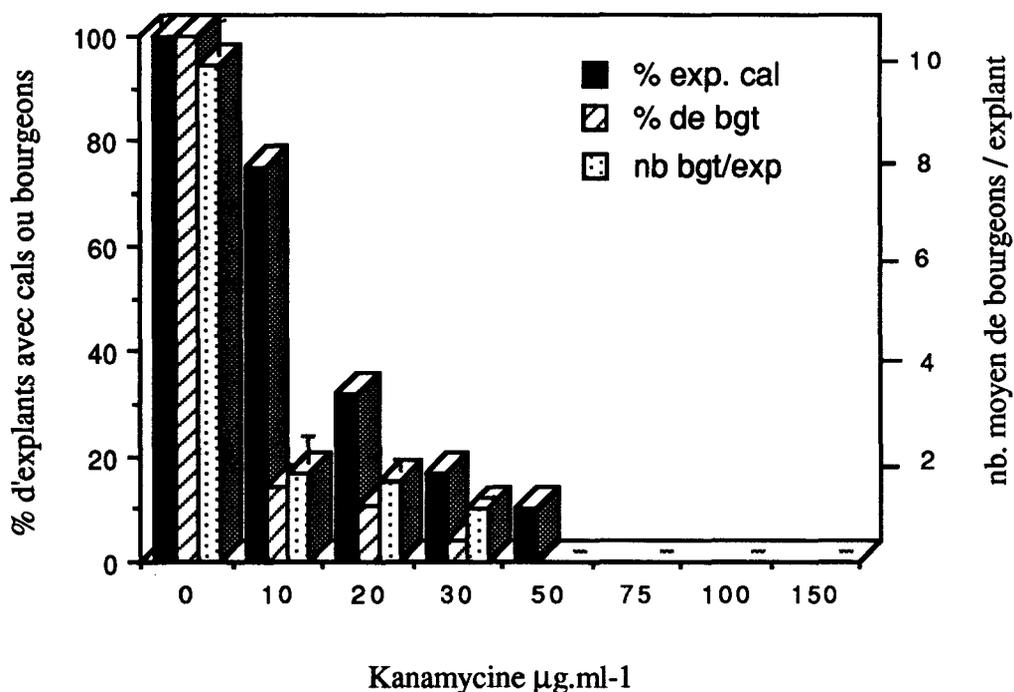


Figure 10 : Test de sensibilité à la kanamycine effectué sur des explants foliaires de *Cichorium intybus* L. var Witloof.

% d'expl. cal : nombre d'explants foliaires avec des cals sur le nombre total d'explants.

% de bgt : % de bourgeonnement : nombre d'explants régénérant des bourgeons sur le nombre total d'explants foliaires testés.

nb bgt/ expl : nombre de bourgeons formés par explant foliaire.

7-3 Explants cotylédonaire

La même gamme de kanamycine utilisée pour les feuilles a été employée sur les explants cotylédonaire étiolés (Figure 11).

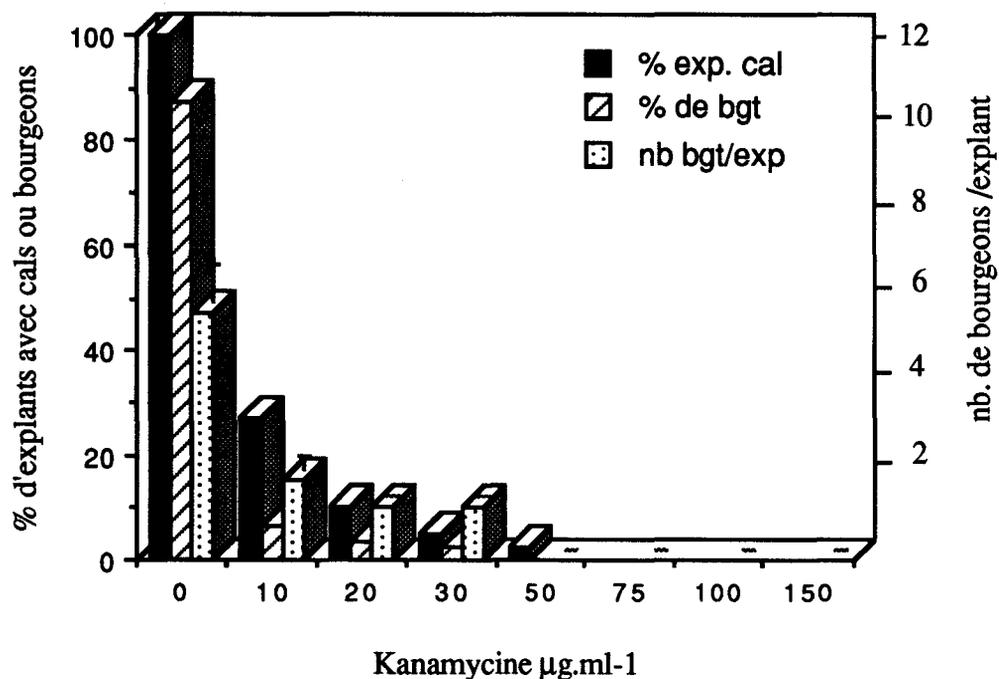


Figure 11 : Test de sensibilité à la kanamycine effectué sur des explants de cotylédons étiolés de *Cichorium intybus* L.

% d'explant.cal : nombre d'explants cotylédonaire avec des cals sur le nombre total d'explant.

% de bgt = % de bourgeonnement : nombre d'explant régénérant des bourgeons sur le nombre total d'explants cotylédonaire testés.

nb bgt/ exp : nombre de bourgeons formés par explant.

Une concentration de kanamycine de $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ inhibe complètement le développement de bourgeons sur les explants cotylédonaire.

8. Conclusion

Les résultats montrent que les différents tissus de la chicorée sont sensibles à la kanamycine et que celle-ci est létale à $75 \mu\text{g. ml}^{-1}$ pour les trois types d'organes. Bien que la sensibilité des feuilles et des cotylédons soit plus importante que celle des explants racinaires, nous avons conservé cette concentration dans toutes nos expériences ultérieures.

II Transformation par *Agrobacterium tumefaciens*

La transformation de la chicorée est envisageable car les processus de la régénération et de l'enracinement sont maîtrisés. Nous avons commencé, pour la transformation des différents organes de la chicorée, par l'utilisation de deux souches d'*Agrobacterium tumefaciens* : la souche pTDE4 et la souche pGSSLUC1. Leur ADN-T comportent deux gènes d'origine bactérienne : le gène de la néomycine phosphotransférase II (*nptII*) qui confère la résistance à la kanamycine et le gène de la β -glucuronidase (gène *uidA*) qui catalyse le clivage de nombreux β -glucuronides. Ces gènes sont régulés par des promoteurs différents : les gènes de l'ADN-T de la construction pGSSLUC1 sont contrôlés par un promoteur double TR 1'-2' de la mannopine synthase ; ceux de la construction pTDE4 sont contrôlés par deux promoteurs différents. Le promoteur 35 S du Virus de la Mosaïque du chou-fleur (CaMV) contrôle le gène *uidA* et le promoteur *nos* de la nopaline synthase précède le gène *nptII*.

Ces deux constructions sont utilisées pour comparer l'expression du gène *uidA* sous le promoteur TR et 35S dans les tissus de la chicorée.

Nous nous sommes également servi d'une troisième souche (LBA4404). Cette souche possède un plasmide binaire pVDH124 qui a le même ADN-T que la construction pTDE4, si ce n'est que la séquence codante du gène de la β -glucuronidase contient un intron (Vancanneyt *et al.*, 1990) empêchant son expression chez les bactéries. Grâce à cette dernière caractéristique, cette souche est utilisée pour cribler les explants pour leur compétence à exprimer les gènes introduits et pour estimer leur efficacité à la transformation.

1. Transformation des explants racinaires

Les fragments de 6 mm de diamètre et de 2 à 3 mm d'épaisseur préparés à partir d'explants racinaires sont co-infectés dans un milieu composé de 1 ml d'une suspension de bactéries qui ont été cultivés pendant une nuit et de 9 ml d'un milieu H5 liquide. Après coculture, les explants sont lavés dans le milieu H5 contenant le céfotaxime puis séchés et transférés sur le milieu de sélection. Ce dernier comprend :

- les éléments minéraux de Heller
- 5 g.l⁻¹ de saccharose
- 75 µg.ml⁻¹ de kanamycine
- 500 µg.ml⁻¹ de céfotaxime

Les explants sont placés dans une salle de culture où la température est de 24 ± 2°C le jour, et 20 ± 2°C la nuit, avec une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité .

Les explants racinaires forment des bourgeons après 15 jours de culture sur le milieu de sélection. Il se forme 1 à 3 bourgeons par explant transformé avec les souches pGSGLUC1 ou pTDE4 (tableau 13) (planche 2A). Lorsque ces bourgeons atteignent une taille de 0,5 à 1 cm, ils sont transférés dans des bocaux contenant le milieu d'enracinement (H10 avec 0,1mg.l⁻¹ de NAM et 75 µg.ml⁻¹ de kanamycine).

La fréquence de transformation, exprimée en pourcent d'explants ayant des bourgeons résistants et rapportée au nombre d'explants mis en culture.

Vecteurs utilisés	Nombre d'explants testés	Explants avec bourgeons résistants	Nombre de bourgeons transformés	Fréquence de transformation (%)
pTDE4	60	3	9	5
pGSGLUC1	57	3	5	5

Tableau 13 : Efficacité de transformation d'explants racinaires de chicorée par les constructions pTDE4 et pGSGLUC1.

Les résultats (tableau 13) indiquent que la fréquence de transformation des explants racinaires est identique pour les deux constructions. Cette fréquence paraissant faible, nous avons alors essayé d'améliorer la transformation en utilisant d'autres facteurs susceptibles d'augmenter son efficacité de transformation. Nous avons testé les effets de l'acétosyringone, d'une durée de coculture de trois jours et de cinq jours, d'un milieu de coculture liquide et enfin d'une condition où une couche de bactérie cultivée en milieu solide a été étendue sur les explants racinaires pendant 24 h ou 48 h.

1-1 Optimisation des conditions de la transformation

1-1-1 Influence de l'acétosyringone

La transformation des plantes par *Agrobacterium* est réalisée après blessure de la plante. Stachel *et al.*, (1985) ont montré que la synthèse de certains composés phénoliques comme l'acétosyringone (AS) ou l'hydroxy-acétosyringone (AS-OH) augmentent au cours de la blessure de *Nicotiana tabacum*. Ainsi, l'infection par *Agrobacterium* nécessite des stimuli produits lors des blessures de cellules. Nous avons pensé que les explants racinaires de la chicorée ne synthétisaient pas suffisamment ces substances au cours de la blessure, c'est pour cette raison que nous avons ajouté à la suspension bactérienne de l'acétosyringone à différentes concentrations sous forme de 3',5'diméthoxy-4-hydroxyacétophénone. Cette gamme (20, 50, 70, 100 μ M) est ajoutée à la suspension bactérienne au moment de l'infection pour augmenter l'efficacité de la transformation et pour déterminer une concentration favorisant au maximum la transformation d'explants racinaires. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.

De façon surprenante, l'acétosyringone est sans effet sur la stimulation de la virulence des souches pTDE4 et pGSGLOC1. En effet, les résultats montrent qu'un traitement par l'acétosyringone n'augmente pas le pourcentage de transformation d'explants racinaires comparé aux explants transformés sans acétosyringone (tableau 14).

Concentrations en AS (μM)	0	20	50	75	100
pGSGLUC1	3/57 (5%)	1/21 (4,8%)	1/25 (4%)	3/61 (4,9%)	3/54 (5,5%)
pTDE4	3/60 (5%)	4/73 (5,4%)	3/55 (5,4%)	2/43 (4,7%)	2/37 (5,4%)

Tableau 14 : Effet de l'acétosyringone sur la fréquence de transformation des explants racinaires de la chicorée.

La fréquence exprimée en nombre d'explants régénérant des bourgeons sur le milieu de sélection par rapport au nombre total d'explants est donnée entre parenthèses.

1-1-2 Influence de la durée de coculture

Dans le but d'augmenter l'efficacité de transformation, nous avons prolongé le temps de contact (plus de 48h) des explants avec les bactéries. Ainsi, avons nous utilisé des durées de contacts plante-bactéries de 3 et 5 jours.

Après une coculture de 3 et de 5 jours, nous remarquons que les explants deviennent rouges puis bruns et quand ils sont transférés sur le milieu de sélection, ils se nécrosent et ne régénèrent pas de bourgeons.

Une durée de coculture de plus de 72 h n'augmente donc pas le taux de transformation, et la meilleure fréquence de transformation est obtenue pour des temps de coculture de 48 h. La croissance bactérienne sur les explants est très importante au bout de trois jours ce qui pourrait entraîner la mort des cellules végétales.

1-1-3 Influence de la nature de l'inoculation

Des expériences préliminaires sur la carotte montrent qu'une inoculation des explants par des bactéries cultivées sur milieu gélosé est efficace pour la transformation (Guivar'h *et al.*, 1992). Nous avons essayé une condition où une couche de bactéries fraîchement cultivées et prélevées directement sur boîte de Pétri, est étendue sur les explants racinaires.

Par ailleurs, une coculture en milieu liquide a été utilisée avec succès chez *Arabidopsis* (Sangwan *et al.*, 1993) Nous avons alors testé cette technique de transformation sur les explants racinaires.

Afin d'éviter un développement très important des bactéries, la durée de contact avec les explants a été réduite. Le temps de coculture est de 24 h aussi bien que lors de l'étalement d'une couche bactérienne sur les explants.

Dans les deux cas, les explants deviennent très friables, fortement envahis par les bactéries. Ceci laisse supposer que les cellules sont en mauvais état physiologique. De plus, les explants ne régénèrent plus aucun organe lorsqu'ils sont transférés sur le milieu de sélection. La chute du taux de transformation de pousses feuillées est probablement induite par un "stress bactérien".

1-2 Test histochimique

Les bourgeons sélectionnés à partir d'explants racinaires, lors d'une coculture de 48 h, ont été analysés pour vérifier l'expression du gène *uidA*. Toutes les premières feuilles des bourgeons testés montrent un test GUS positif, témoignant de la présence du gène *uidA*. Cependant, quand le test est effectué sur de nouvelles feuilles (stades trois feuilles et plus), l'expression du gène est absente. Ceci suggère que les bourgeons issus de racines tubérisées sont chimériques. En effet, il est probable que l'antibiotique diffuse trop lentement dans les tronçons de racines tubérisées, ce qui conduit à la formation de bourgeons chimériques échappant à la sélection. La présence de cellules transformées permet de détoxifier l'antibiotique ce qui favorise le développement de bourgeons à partir de cellules non transformées. L'activité GUS finira par disparaître dans les bourgeons du fait de la dilution des cellules transformées pendant la croissance de la plantule.

L'expression peut être aussi transitoire si l'ADN-T n'est pas intégré dans le génome des cellules.

Il aurait peut être fallu, pour surmonter cet obstacle, augmenter le niveau de sélection en utilisant des concentrations plus élevées de kanamycine, ce qui aurait limité l'obtention de bourgeons chimériques.

1-3 Conclusion

La mise au point d'un protocole de transformation de la chicorée à partir d'explants racinaires n'a pas donné entière satisfaction. Des bourgeons chimériques sont obtenus. Ils présentent une activité GUS instable dans le temps.

Nous avons décidé d'abandonner l'utilisation d'explants de racines tubérisées pour plusieurs raisons :

- les réserves importantes contenues dans les explants racinaires sont à l'origine d'une rapide différenciation de bourgeons ce qui peut être néfaste à la transformation. En effet, les bourgeons pourraient se différencier avant que la transformation ne soit effective, ce qui pourrait conduire à la production de plantes chimériques.

- le développement de cellules sensibles à la kanamycine dans un explant racinaire transformé aurait pu passer inaperçu au cours de la sélection. Les cellules transformées sont diluées dans la masse cellulaire qui différencie des organes et par conséquent, une expression instable sera très fréquente.

- les explants racinaires sont constitués essentiellement de cellules cambiales qui possèdent des caractéristiques méristématiques et qui se sont révélées incompetentes à la transformation.

2. Transformation des explants foliaires et cotylédonaire

Les explants foliaires et cotylédonaire blessés transversalement ou longitudinalement sont mis en contact avec une culture bactérienne d'une nuit diluée au 1/10 dans le milieu MS liquide. Les explants sont laissés dans ce milieu pendant 20 min puis sont séchés sur du papier filtre stérile avant d'être placés sur le milieu M'2 pour la coculture. Après une coculture de 48 h, les explants sont rincés dans un milieu MS contenant de la céfotaxime, séchés sur papier filtre stérile et transférés sur le milieu de sélection. Ce dernier comprend :

- le milieu M'2
- 10 g.l⁻¹ de saccharose
- 75 µg.ml⁻¹ de kanamycine
- 500 µg.ml⁻¹ de céfotaxime

Les antibiotiques sont susceptibles d'être dégradés, le milieu de sélection est renouvelé toutes les trois semaines.

Les conditions de culture pendant la sélection sont identiques à celles utilisées pour les explants racinaires.

A l'issue de ces premiers essais de transformation, nous avons remarqué que les explants foliaires et cotylédonaire développent des cals qui se dessèchent rapidement. Etant donné cette sensibilité des tissus de chicorée à l'agent sélectif, la concentration létale de kanamycine n'a pas été immédiatement utilisée. Une stratégie de sélection en deux temps a été employée. Dans un premier temps, une concentration de 50 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ de kanamycine a été appliquée pendant 5 jours, puis les explants ont été transférés sur un milieu contenant 75 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ de kanamycine.

Nous avons également utilisé, pour la suite du travail, de l'acétosyringone à 100 μM qui est ajoutée à la suspension bactérienne au moment de l'infection.

Des expériences réalisées en présence de 50 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ de kanamycine et de 100 μM d'AS ont permis la formation de cals puis de bourgeons sur les explants foliaires et cotylédonaire à l'endroit des incisions (planche 2B, 2C). Afin d'éviter les effets inhibiteurs des cellules mortes non transformées qui peuvent entourer les cellules transformées (Everett *et al.*, 1987 ; Graham et McNicol, 1990), le cal portant les bourgeons néoformés est séparé de l'explant-mère et remis en culture sur un nouveau milieu de sélection.

Le nombre de bourgeons obtenus varie de 1 à 4 par explant foliaire ou cotylédonaire. Les résultats (tableau 15) montrent que les explants cotylédonaire présentent le pourcentage de transformation le plus élevé (15%), pour la souche pTDE4. Il est faible avec la souche pGSGGLUC1. Toutefois, les cotylédons constituent toujours un bon tissu de transformation pour la chicorée.

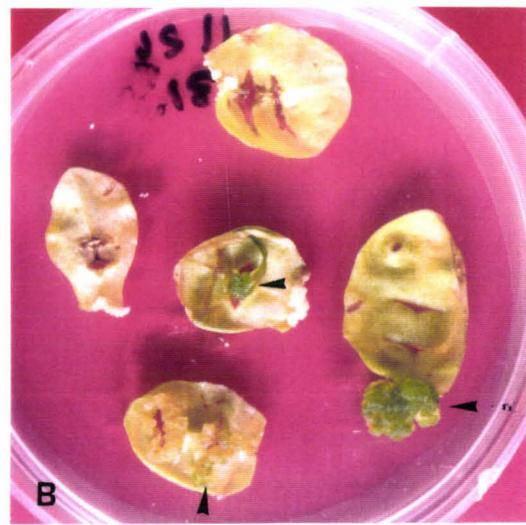
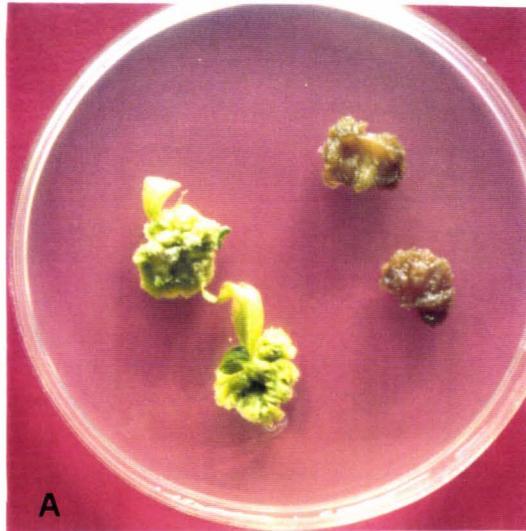
Bien que les feuilles aient une grande capacité de régénération par rapport aux cotylédons, leur fréquence de transformation est faible. Pour les feuilles, et avec la souche pTDE4, cette fréquence est de 9% alors qu'elle est de 15% pour les cotylédons. Les cotylédons constituent donc l'organe le plus apte à la transformation de la chicorée.

PLANCHE 2

Transformation génétique sur différents organes de la chicorée via *Agrobacterium tumefaciens*

Figures A, B et C : les différents explants de la chicorée sont cocultivés pendant 48h avec les agrobactéries, puis repiqués sur milieu de régénération en présence de 75 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ de kanamycine et de 500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de céfotaxime (milieu de sélection) pendant trois semaines. **(A)** : les explants de racines tubérisées régénèrent des bourgeons transformés sur le milieu de sélection (flèche à gauche) alors que les sensibles ne bourgeonnent pas (flèche à droite). **(B)** : seuls les explants foliaires transformés produisent des pousses feuillées en présence de kanamycine (flèches). **(C)** : des bourgeons transformés apparaissent au niveau des blessures effectuées sur les cotylédons (flèches).

Planche 2



Explant	Vecteurs	Nombre d'explants testés	Explants avec bourgeons résistants	Nombre de bourgeons transformés	Fréquence de transformation (%)
feuille	pTDE4	45	4	11	9
	pGSGLUC1	84	5	7	6
Cotylédon	pTDE4	60	9	21	15
	pGSGLUC1	71	7	13	10

Table 15 : Efficacité de transformation d'explants foliaires et cotylédonaire de chicorée avec les souches pTDE4 et pGSGLUC1.

2-1 Evénement transformationnel précoce

Afin de tester la sensibilité de la chicorée à une autre souche d'*Agrobacterium tumefaciens*, nous avons utilisé la souche LBA4404 contenant le plasmide pVD1124. Cette souche possède comme gène de sélection le gène *nptII* placé derrière le promoteur nos et comme gène marqueur le gène *uidA* qui contient un intron dans sa séquence. La bactérie est incapable d'effectuer l'épissage et donc l'expression du gène *uidA*-intron ne se fait pas dans la bactérie. Cette souche permet l'étude des événements transformationnels précoces suivant la coculture. En effet, la coculture des explants avec *Agrobacterium* conduit à l'agrégation de bactéries sur toute la surface des explants au bout de 48 h. Après le rinçage une grande partie des bactéries est éliminée. Mais des bactéries ayant pénétré les vaisseaux et les méats intercellulaires ne sont éliminées que plus tard. Ainsi le test GUS précoce, qui peut déjà être réalisé au bout d'une semaine, empêche tout artefact de transformation qui pourrait se produire si le gène *uidA* ne contenait pas d'intron.

L'utilisation de cette souche d'*Agrobacterium tumefaciens* permet donc une détermination précoce de l'efficacité des conditions de transformation et une localisation des cellules infectées au niveau de l'explant végétal.

Des explants foliaires et cotylédonaire transformés par cette souche ont subi un test GUS qui permet de visualiser les cellules transformées par la construction pVD1124. Le test a

été fait une semaine après la coculture des explants. Les résultats (planche 3A, 3B) montrent d'une part que l'infection bactérienne concerne surtout les régions des blessures qui favorisent la prolifération de cals puis la différenciation de bourgeons. D'autre part l'efficacité de transfert et d'expression du gène rapporteur est largement supérieure pour les cellules du tissu cotylédonaire que pour celles des tissus foliaire. De plus, les résultats (tableau 16), indiquent que les explants cotylédonaire présentent une efficacité de transformation plus élevée que les explants foliaires. Les résultats du test GUS précoce confirme le fait que les explants cotylédonaire constituent l'organe le mieux adapté à la transformation de la chicorée.

Origine de l'explant	Nombre d'explants testés	Explants avec bourgeons résistants	Fréquence de transformation (%)
Feuilles	49	3	6
Cotylédons	47	4	8,5

Tableau 16 : Efficacité de transformation d'explants foliaires et cotylédonaire de chicorée avec la construction pVD1124 d'*Agrobacterium tumefaciens*.

La chicorée est capable d'être transformé par la souche pVD1124. Cependant la fréquence de transformation est faible par rapport à la souche pTDE4. Toutefois, pour les trois constructions utilisées, la fréquence de transformation reste importante pour les explants cotylédonaire.

2-2 Effet d'une préculture

Les tissus de la chicorée réagissent mieux à la construction pTDE4 qui favorise une meilleure transformation par rapport aux deux autres constructions utilisées (pGSGLOC1 et pVD1124). Ainsi, afin d'optimiser la transformation de la chicorée, nous avons testé l'effet d'une préculture de 3 jours d'explants foliaires et cotylédonaire avec la souche pTDE4. La préculture est faite sur un milieu qui induit la callogenèse. Les explants dilacérés sont déposés sur le milieu M'2 additionné de 0,1 mg. l⁻¹ de 2,4-D. Une cicatrisation apparaît au niveau de

blessures au bout de 72h de préculture. Après l'étape de coculture de 48 h , les explants sont transplantés sur un milieu contenant la concentration létale de kanamycine. Cette opération vise à réduire les risques d'échappement qui pourraient résulter des proliférations cellulaires induits pendant la phase de préculture.

Origine de l'explant	Nombre d'explants testés	Explants avec bourgeons résistants	Fréquence de transformation (%)
Feuilles	64	10	16
Cotylédons	84	9	11

Tableau 17 : Fréquence de transformation avec le vecteur pTDE4 après 3 jours de préculture des explants foliaires et cotylédonaires.

Les résultats (tableau 17) montrent que la fréquence de transformation est augmentée chez les explants foliaires d'un facteur de 1,8 après une phase de préculture de 3 jours. Curieusement, chez les explants cotylédonaires, la fréquence de transformation est diminuée par rapport à la condition sans préculture.

Nous n'avons pas essayé de durées de préculture au delà de trois jours pour la simple raison qu'un prétraitement hormonal induit la formation d'un cal blanchâtre incapable de régénérer des bourgeons (planche 3C).

La préculture de feuilles de chicorée pendant 3 jours a permis l'induction d'un cal sur lequel s'est différencié un nombre important de bourgeons. Il est probable que l'induction de cal a augmenté le nombre des cellules compétentes à la transformation. Le transfert des explants, après la coculture, sur un milieu d'induction de bourgeons (milieu avec BAP uniquement) est nécessaire pour provoquer la transition d'une prolifération de cal à une croissance organisée qui aboutira à une différenciation de bourgeons néoformés.

PLANCHE 3

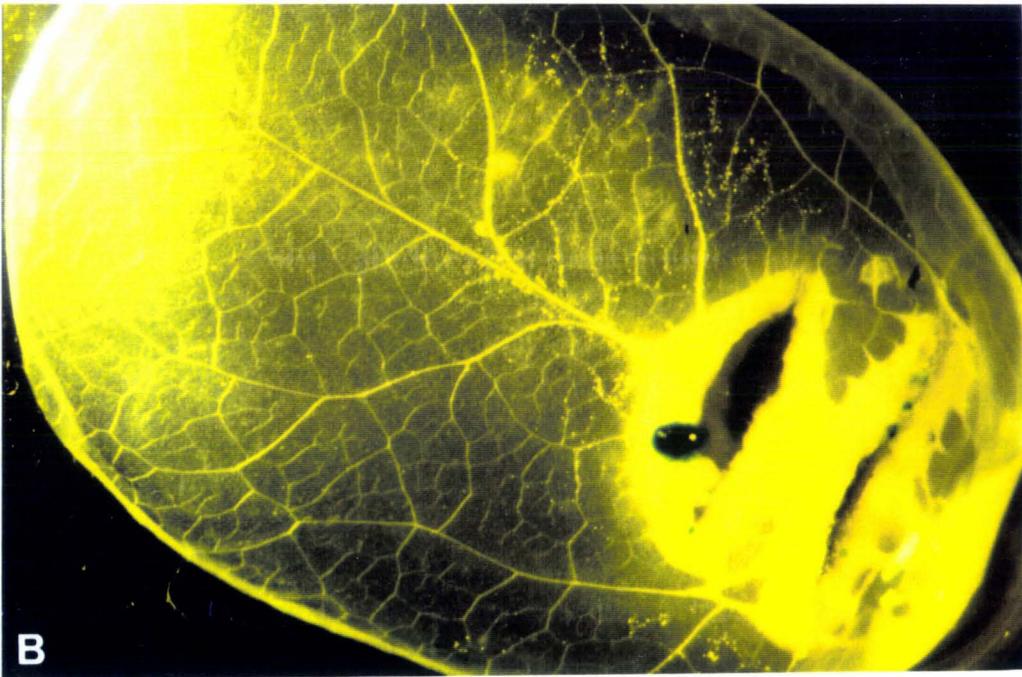
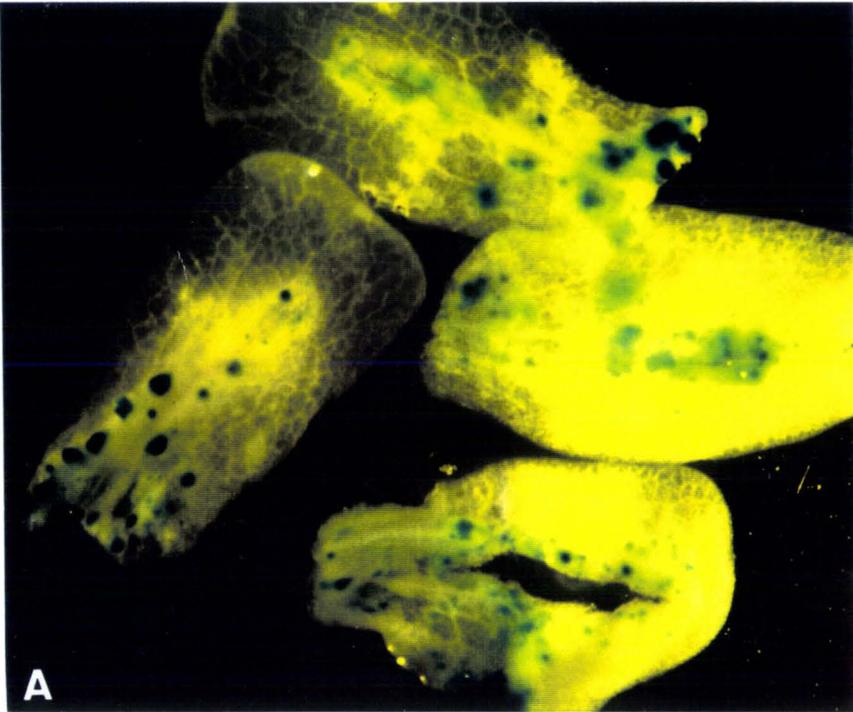
Figures A et B : Analyse histochimique effectuée sur les cotylédons et les feuilles de *Cichorium intybus* L.

Les fragments cotylédonaire (A) et foliaires (B) ont été cultivés deux jours avec l'agrobactérie (pVD1124) ayant un intron dans le gène *uidA*, sur le milieu de régénération sans agent sélectif, puis cultivés sur le milieu de régénération contenant $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de kanamycine et $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de céfotaxime. Ces fragments sont ensuite incubés à 37°C en présence du X-GLUC afin de révéler l'activité de la β -glucuronidase. On peut remarquer sur la figure A, que les cotylédons montrent plusieurs zones colorées en bleu à l'endroit des incisions. par contre sur les feuilles, figure B, très peu de zones présentent la coloration bleue.

Figures C et D : Effet d'une étape de préculture sur les explants foliaires.

Des fragments foliaires sont cultivés pendant trois jours (figure D) ou plus (figure C) sur le milieu M2 d'induction de callogenèse ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 2,4-D et $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP) puis cultivés pendant trois semaines sur le milieu M'2 ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP). On peut remarquer qu'une étape de préculture de plus de trois jours (figure C) ne favorise pas la formation de bourgeons.

Planche 3



Afin de vérifier la stabilité de la transformation des bourgeons, le test GUS est effectué aux différents stades de développement des bourgeons transformés. Il révèle une activité β -glucuronidase stable au cours du développement de la plantule.

Les bourgeons qui se différencient au bout de 2 à 3 semaines de sélection, sont repiqués sur le milieu d'enracinement contenant $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de kanamycine.

Bien que l'amélioration de l'enracinement ait été étudiée, il semble que l'enracinement soit rendu difficile par la présence de l'antibiotique. Ici encore, nous avons envisagé un enracinement sur le milieu sélectif en deux temps. Dans un premier temps, les bourgeons sont transférés dans des bocaux contenant une concentration plus faible de kanamycine ($50 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Dans un second temps, des milieux contenant $75 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de kanamycine ont été utilisés. Nous avons constaté que 60% de ces bourgeons s'enracinent et se développent sur le milieu de sélection.

La différence entre un bourgeon transformé et un non-transformé est facilement observée. En effet, après deux semaines de culture sur le milieu de sélection, les bourgeons non-transformés blanchissent et se nécrosent, alors que les bourgeons transformés continuent à se développer. La vitrosité et la taille réduite de certains bourgeons qui ne se développent plus après avoir atteint une taille de 0,5 mm ont été responsables de la perte de plusieurs bourgeons transformés non enracinés.

2-3 Conclusion

L'optimisation du protocole de transformation des explants foliaires et cotylédonaire de la chicorée par *Agrobacterium tumefaciens* a permis de développer une méthode de transformation qui se révèle rapide et efficace. Cette méthode permet de régénérer des plantes transgéniques présentant un phénotype normal. Cette optimisation révèle d'une part l'intérêt des explants cotylédonaire pour la transformation et d'autre part l'importance d'une préculture des explants foliaires, en présence d'hormones ($0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D et $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP), avant l'infection bactérienne.

En ce qui concerne les explants foliaires, une étape de préculture de trois jours était nécessaire pour améliorer la transformation. Ceci montre que la préculture provoque une

reprise d'activité cellulaire pour une transformation efficace des cellules de l'explant. La préculture pourrait entraîner une accumulation de substances activant la virulence et pourrait faciliter l'adhésion de la bactérie à la cellule végétale.

Pour les cotylédons, un protocole simple et rapide a été mis au point. En effet, une amélioration de la fréquence de la transformation a été réalisée en présence de l'acétylsyringone. Au bout de trois semaines, des bourgeons transformés se forment. Une préculture n'améliore pas la fréquence de transformation et aurait même tendance à la diminuer. Il nous apparaît intéressant de procéder également à une analyse histologique afin de suivre l'évolution des cellules cotylédonaires.

3. Adhésion bactérienne

Afin de déterminer si la nature de l'organe prélevé ou si la phase de préculture influait sur l'adhésion des bactéries, des observations en microscopie électronique à balayage ou par transmission ont été effectuées. Les résultats montrent que la densité bactérienne varie avec la nature de l'organe étudié, ainsi qu'avec les conditions de culture.

Les explants racinaires, foliaires et cotylédonaires, ayant subi ou non une étape de préculture, ont été infectés par une suspension bactérienne préparée à partir de la souche pTDE4. Après 48 h de coculture, les explants sont rincés avec du tampon cacodylate 0,1M pH 7,2 par agitation manuelle pendant 20 s. Les échantillons sont ensuite préparés suivant la méthode de McCowan *et al.* (1978). L'observation en microscopie électronique à balayage permet de mettre en évidence les bactéries sur la surface de l'explant. Pour la microscopie électronique à transmission des coupes très fines (0,6 μm) ont été réalisées sur ces mêmes explants afin de mettre en évidence les bactéries à la surface des cellules.

3-1 Condition sans préculture

a- Racines tubérisées

Les observations faites en microscopie électronique par balayage montrent que les bactéries sont surtout présentes sur le bord de l'explant racinaire qui correspond à la zone de

coupure de l'explant (planche 4A). Par contre, leur densité devient très faible au centre de l'explant (planche 4B). Les bactéries semblent être attirées par les cellules de l'assise génératrice constituée de cellules cambiales. Les résultats des coupes faites en microscopie électronique à transmission montrent que les bactéries sont surtout présentes dans les méats intercellulaires (planche 4E).

b- Feuilles

Sur les explants foliaires, la densité des bactéries est très importante au niveau des incisions (planche 5A). Par ailleurs, les bactéries sont peu nombreuses sur les surfaces foliaires non blessées (planche 5B). Ce résultat confirme que l'infection bactérienne nécessite des surfaces blessées qui peuvent produire des stimuli attirant *Agrobacterium*.

La présence d'une cuticule doit empêcher l'adhérence des bactéries. L'analyse des coupes sur microscope électronique à transmission montre que très peu de bactéries sont présentes entre les cellules (planche 5E).

c- Cotylédons

Toute la surface cotylédonnaire est envahie par les bactéries (planche 6B) et leur présence est surtout importante au niveau des blessures (planche 6A). Les coupes observées en microscopie électronique à transmission montrent que les bactéries semblent être attachées à la paroi cellulaire (planche 6E, 6F).

3-2 Condition avec préculture

Les explants foliaires et cotylédonnaires sont mis en préculture pendant 3 jours sur le milieu de MS contenant 0,1 mg.l⁻¹ de BAP ; 0,1mg.l⁻¹ 2,4-D et 10 g.l⁻¹ de saccharose. La coculture de ces explants en présence de bactéries dure 48h.

a- Racines tubérisées

La densité bactérienne est importante au niveau des blessures, mais nettement plus faible au centre de l'explant (planche 4C, 4D, 4F). Ce résultat est comparable à celui observé

dans des conditions sans préculture. Celle des explants issus de racines tubérisées n'a pas d'effet sur la colonisation des explants par les bactéries.

b- Feuilles

Les bactéries sont présentes en forte densité sur toute la surface de l'explant (planche 5C, 5D). Il semblerait que la préculture attire d'avantage les bactéries favorisant leur adhésion sur toute la surface foliaire. L'analyse des coupes en microscopie électronique à transmission révèle une forte présence des bactéries à la surface des cellules (planche 5F).

c- Cotylédons

Les bactéries sont surtout localisées au niveau de l'incision (planche 6C, 6D). Leur présence est faible dans les parties non blessées contrairement à ce qui a été observé sur cotylédons sans préculture. En microscopie à transmission on observe, à proximité des cellules, la formation d'une couche extracellulaire dont la nature n'a pas été déterminée (planche 6H).

3-3 Conclusion

Chez les explants racinaires, malgré la forte présence des bactéries sur leur bords, la transformation reste faible. Ce résultat peut s'expliquer par l'incompétence à la transformation des cellules méristématiques des explants racinaires de la chicorée.

Contrairement aux explants racinaires, il semble exister une corrélation entre la densité élevée de bactéries sur les explants foliaires et cotylédonaires et l'aptitude à la transformation.

Pour les explants foliaires, une préculture de trois jours, où la fréquence de transformation est élevée, conduit à une forte agrégation des bactéries sur toute la surface de l'explant. La préculture semble être efficace pour la transformation des explants foliaires par *Agrobacterium*.

PLANCHE 4

Analyse de l'adhésion bactérienne au niveau tissulaire et cellulaire des explants de racines tubérisées à l'aide de la microscopie électronique à balayage et à transmission

En microscopie électronique à balayage

Les explants sont cultivés sans l'étape de préculture Figures **A** et **B** et avec une étape de préculture Figures **C** et **D**

On note qu'en (**A**) et (**C**), les bactéries s'attachent au bord de l'explant (flèche) tandis que qu'en (**B**) et (**D**) elles se trouvent au centre de l'explants.

Barre = 10 μm .

En microscopie électronique à transmission

Les explants racinaires sont cultivés sans préculture figure **E** et avec préculture figures **F**. Sur les deux figures, nous notons la présence des bactéries au niveau des méats intercellulaires.

Barre = 2 μm .

Planche 4

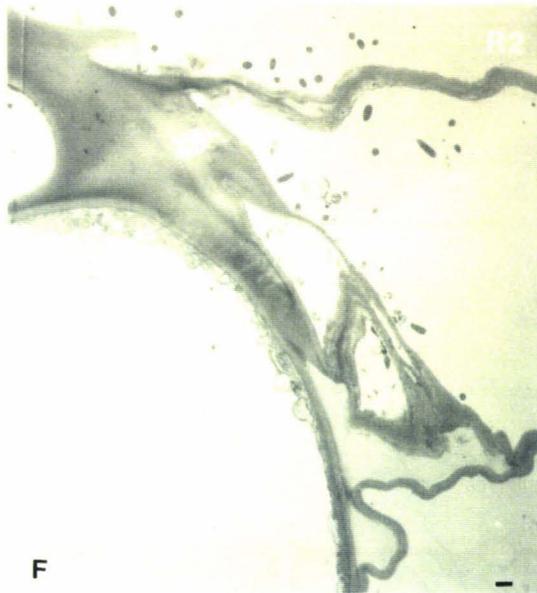
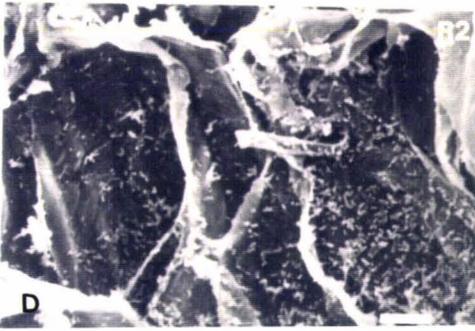
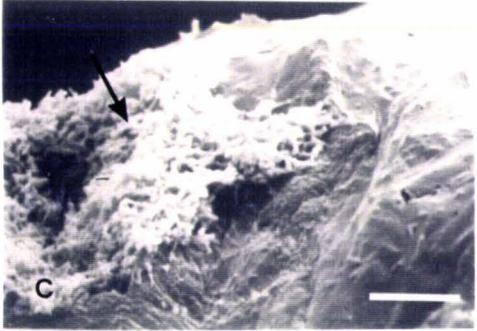
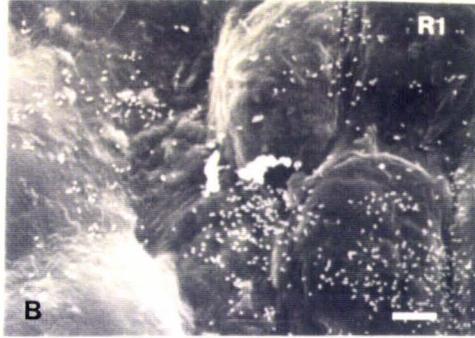


PLANCHE 5

Analyse de l'adhésion bactérienne au niveau tissulaire et cellulaire des **explants foliaires** à l'aide de la microscopie électronique à balayage et à transmission

En microscopie électronique à balayage

Les explants foliaires sont cultivés sans preculture figure **A** et **B** et avec preculture **C** et **D**. En (**A**) et (**C**), les bactéries sont concentrées au niveau des incisions, alors qu'au niveau tissulaires (**C**) et (**D**) elles sont dispersées. On note une forte densité des bactéries après l'étape de préculture (figures **A** et **C**).

Barre = 10 μm .

En microscopie électronique à transmission

Les explants foliaires sont cultivés sans préculture figure **E** est on note une très faible présence des bactéries au niveau cellulaire. Après preculture, les bactéries se retrouvent en forte densité aux contacts des cellules (**F**).

Barre = 2 μm .

Planche 5

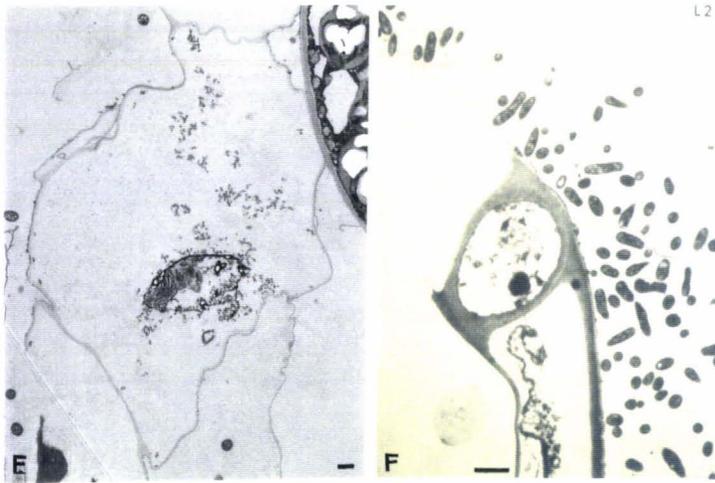
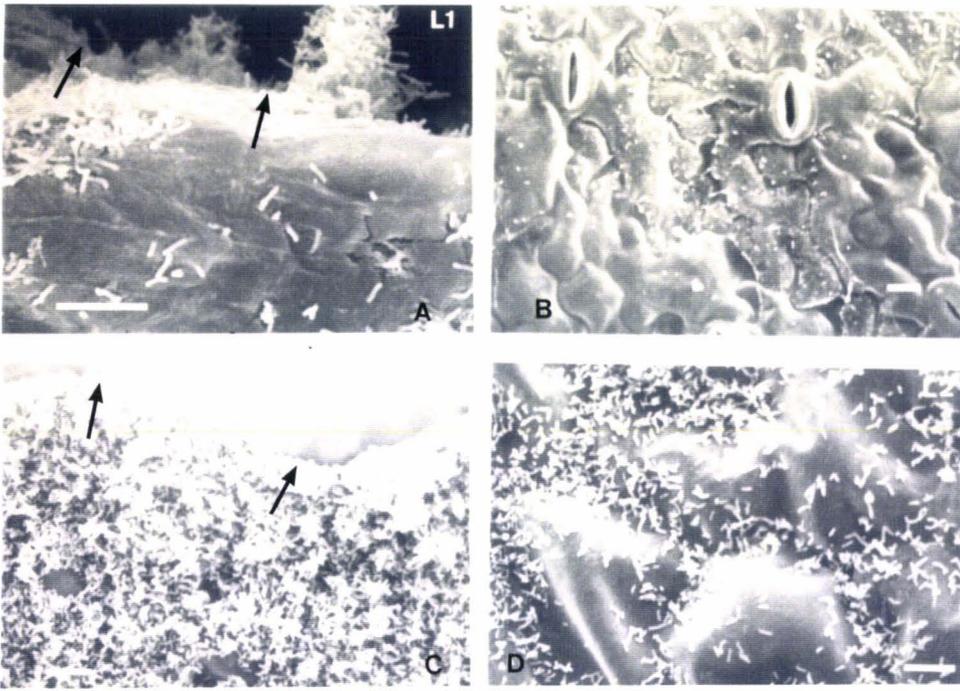


PLANCHE 6

Analyse de l'adhésion bactérienne au niveau tissulaire et cellulaire **des explants cotylédonaire**s à l'aide de la microscopie électronique à balayage et à transmission

En microscopie électronique à balayage

Sans préculture

(A) : les bactéries sont fortement présentes au niveau des incisions (flèches) et sur toute la surface cotylédonnaire (B).

Avec préculture

(C) : Agrégation des bactéries au niveau des incisions.

(D) : Agrandissement de l'encadré en C.

Barre = 10 μm .

En microscopie électronique à transmission.

Sans préculture

(E) : Mise en évidence des bactéries contre les parois cellulaires

(F) : Agrandissement d'une partie de la photo en (E).

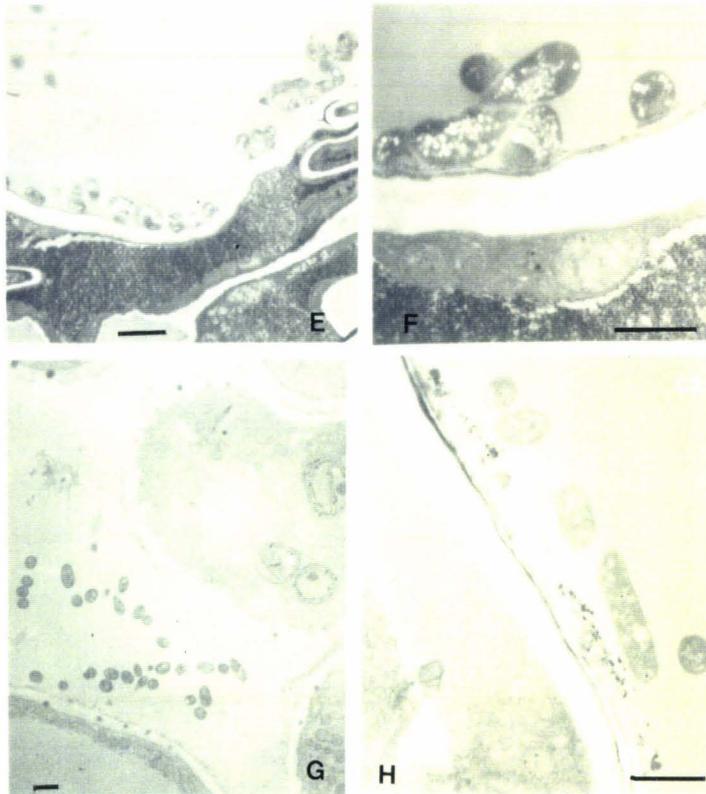
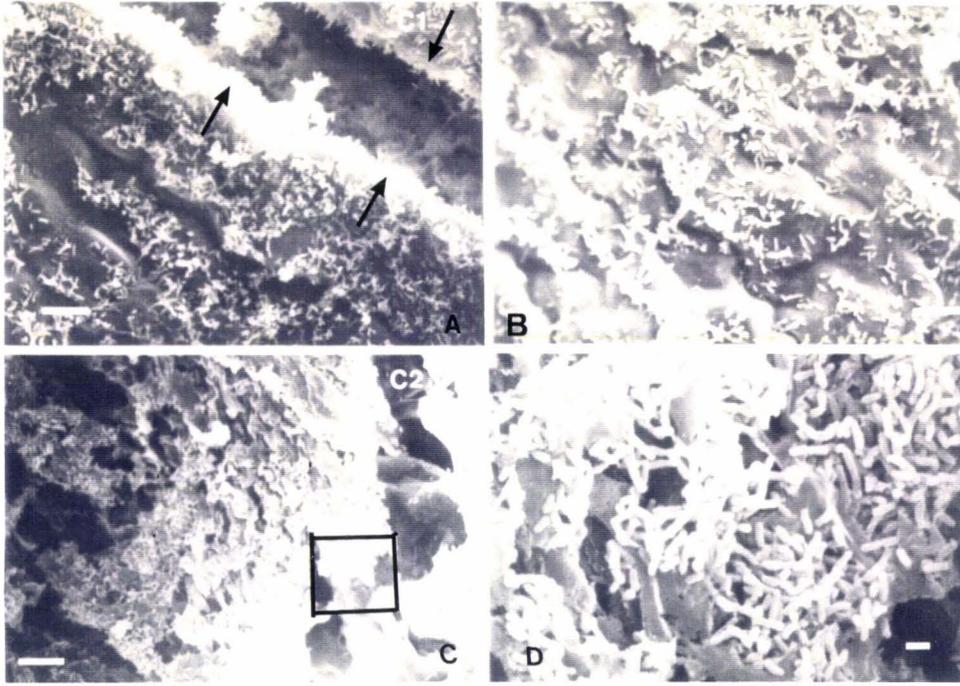
Avec préculture

(G) : Présence bactérienne entre les cellules

(H) : Mise en évidence d'une couche extracellulaire au niveau de la paroi

Barre = 2 μm .

Planche 6



En ce qui concerne les explants cotylédonaire, l'étape de préculture n'a pas d'effet sur leur colonisation par les bactéries et par conséquent, sur la fréquence de transformation. Cependant, l'analyse en microscopie à transmission a révélé la présence de bactéries entre les cellules. La question qui se pose maintenant est de savoir si la couche extracellulaire formée suite à la préculture des explants cotylédonaire ne serait pas responsable d'une faible régénération des explants cotylédonaire.

4. Détection de protéine type vitronectine et fibronectine

Chez les plantes, la première surface exposée aux bactéries est la paroi. La participation d'adhésines bactériennes et végétales à l'attachement des bactéries aux parois végétales a déjà été décrite. Ainsi, lorsque l'adhésion s'établit, les bactéries s'attachent ensuite par la mise en place d'interactions spécifiques entre deux structures complémentaires, l'une localisée à la surface bactérienne, l'autre au niveau de la cellule reconnue. Nous voulions savoir si un tel mécanisme existe chez la chicorée. Pour cela nous avons, dans un premier temps, cherché si les protéines de type vitronectine et fibronectine, décrites chez plusieurs espèces végétales, existent dans les tissus de la chicorée. Nous nous sommes servis d'un anticorps monoclonal anti-vitronectine et d'anticorps monoclonal dirigé contre de la fibronectine humaine pour détecter ces protéines de surface.

Après fixation décrite (matériels et méthodes), les explants de la chicorée ont été incubés en présence d'un anticorps monoclonal anti-vitronectine ou d'anticorps anti-fibronectine. Un second anticorps anti souris marqué à la fluorescéine a été utilisé pour mettre en évidence les protéines de types vitronectine et fibronectine.

Les résultats montrent que les tissus des racines tubérisées ne présentent pratiquement pas de protéines type vitronectine contrairement aux tissus cotylédonaire et surtout aux tissus foliaires. Les protéines de type fibronectine n'ont été détectées chez aucun organe de la chicorée.

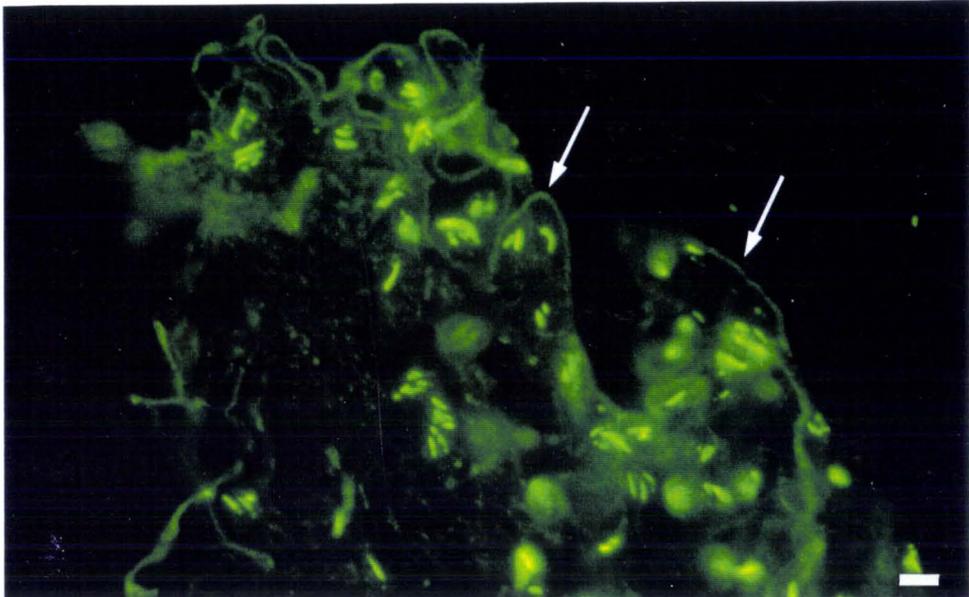
Pour localiser précisément la protéine type vitronectine sur les cellules, des coupes très fines (0,6 μm) ont été réalisées sur des fragments foliaires. Les coupes ont été traités par les anticorps anti-vitronectine ou anti-fibronectine et la révélation du marquage a été effectuée à l'aide d'anticorps marqué à la fluorescéine. L'analyse en microscopie à fluorescence à une longueur d'onde de 490 nm, indique une fluorescence caractéristique de la FITC ce qui pourrait

correspondre à des protéines type vitronectine. Celle-ci existe au niveau pariétal et dans des structures discrètes apparemment localisées dans le cytoplasme des cellules. D'après leur disposition parfois ordonnée et leur taille apparente, ces structures pourraient correspondre à du dictyosome (planche 7). Ces résultats préliminaires nécessitent d'être plus approfondi dans le cadre de la mise en évidence de l'adhésion d'*Agrobacterium tumefaciens* aux cellules de la chicorée par l'intermédiaire de récepteurs protéiques de type vitronectine.

Les protéines de type fibronectine n'ont pas été mises en évidence dans ces coupes de tissu foliaire de la chicorée.

PLANCHE 7

Détection d'une protéine type vitronectine par immunodétection
sur des coupes de feuilles de chicorée



Une forte fluorescence caractéristique de la fluorescéine est présente sur les parois cellulaires (flèches) et dans des organites qui pourraient être des dictyosomes.

Barre = 10 μm

5. Analyse de l'activité β -glucuronidase chez les plantes transgéniques

5-1 Activité du gène *uidA* chez les plantes transformées par la souche pGSGLUC1

Afin de caractériser qualitativement et quantitativement l'activité GUS dans les transformants, nous avons utilisé des tests histochimique et spectrofluorimétrique.

5-1-1 Analyse histochimique

Pour étudier l'expression du gène *uidA* sous le contrôle du promoteur TR 2' dans les divers organes et à différents stades de développement des plantes transformées et dans la génération F1, le test GUS est effectué sur des fragments de racines, de feuilles, sur des fleurs, du pollen, des graines et sur de petites plantules issues de la germination de plantes transgéniques.

Ces différents échantillons sont incubés dans du tampon phosphate de sodium 50 mM contenant 1 mM du substrat X-GLUC. Après des temps d'incubation variables à 37°C, une coloration bleue se développe au niveau du site d'activité de l'enzyme. Sous un microscope à fond noir, l'activité β -glucuronidase se traduit par une coloration rose.

a- Activité GUS dans les racines des transformants primaires

Dans les racines, l'expression est présente dans l'apex, où elle est particulièrement intense dans le méristème racinaire. L'expression est aussi importante dans la zone d'élongation apicale, dans les cellules corticales, dans l'épiderme et dans le système vasculaire proche de la zone apicale (planche 8A). Cependant, plus on s'éloigne de l'apex, plus l'intensité de coloration devient faible. L'expression décroît dans le cortex interne et dans le système vasculaire (planche 8B). Dans la zone d'élongation, l'expression est limitée au cortex extérieur (planche 8C), puis elle décroît complètement dans les cellules corticales (planche 8D) jusqu'à ce qu'elle devienne indétectable dans le reste de la racine.

Le dôme méristématique donnant naissance à une racine secondaire présente également une activité β -glucuronidase.

b- Activité GUS dans les feuilles

Dans les feuilles, l'activité GUS est principalement localisée dans le tissu vasculaire, dans les cellules du mésophylle et dans l'épiderme (planche 8E, 8F). Les stomates et les trichomes montrent également une expression du gène *uidA*.

c- Activité GUS dans le capitule

L'inflorescence de la chicorée est le capitule. Ce dernier est involuqué et l'épanouissement des fleurs, une vingtaine par capitule, sur un réceptacle plat est centripète. Les bractées se disposent à l'extérieur du capitule en formant un involucre général. Les fleurs sont ligulées. En effet, les pétales soudés constituent une languette de cinq dents. L'ovaire est uniloculaire avec un ovule anatrope basal. Les anthères sont soudés constituant le manchon staminal que traverse le style.

A l'aide du vibratome, des coupes de 100 µm sont réalisées depuis le réceptacle floral jusqu'aux anthères. Les coupes sont immergées dans le tampon de réaction en présence de X-GLUC. Après incubation à 37°C, les coupes sont observées sous microscope en lumière blanche.

Les résultats montrent que l'expression du gène *uidA* est localisée dans les tissus vasculaires du réceptacle floral (planche 9A, 9B et 9C). Dans la ligule, l'expression est localisée aux extrémités dans des régions méristématiques. Dans l'ovule (planche 9D) et dans l'étamine (planche 9E), l'activité GUS est localisée uniquement dans le système vasculaire.

Le pollen libéré par l'ouverture des loges polliniques est recueilli dans une boîte de Pétri contenant le tampon de réaction en présence du X-GLUC. Après incubation à 37°C, le pollen est mis sur une cellule de Nageotte et le nombre de grains de pollen bleus est compté sous microscope. D'une façon surprenante, un nombre très faible de grains de pollen (1%) exprime le gène *uidA* (planche 9F). Ce résultat confirme ceux de Langridge *et al.* (1989) obtenus sur le pollen de tabac. Le promoteur TR ne permet pas l'expression du gène *uidA* dans le pollen.

PLANCHE 8

Expression du gène *uidA* contrôlé par le promoteur TR2 dans les racines et dans les feuilles.

Figures A, B, C et D : Activité GUS dans les racines. L'activité β -glucuronidase se traduit par une coloration rose (observation sur fond noir).

(A) : coupe longitudinale de l'apex de la racine

(B), (C) et (D) : coupe transversale montrant une activité GUS dans le cortex racinaire (B) et (C) et dans l'assise pilifère de la racine (D).

Barre = 100 μ m.

Figures E et F: Activité GUS dans les feuilles

(E) : feuille mature. Barre = 1 mm

(F) : coupe transversale du tissu foliaire.

Barre = 100 μ m.

Planche 8

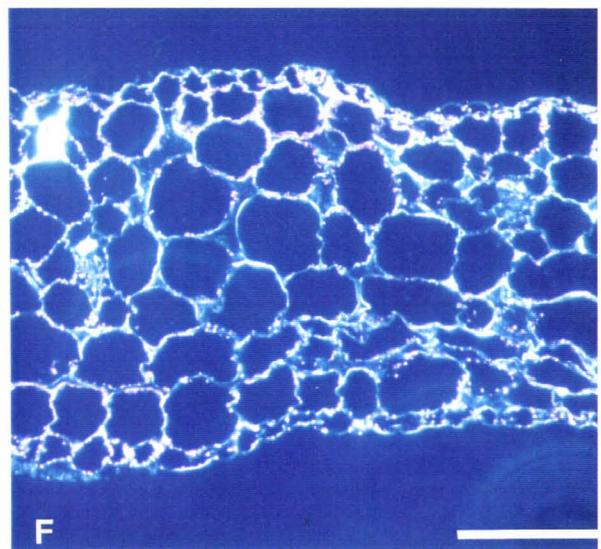
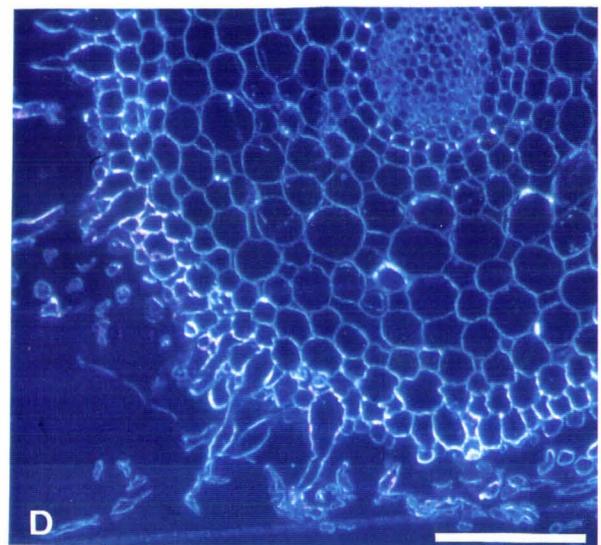
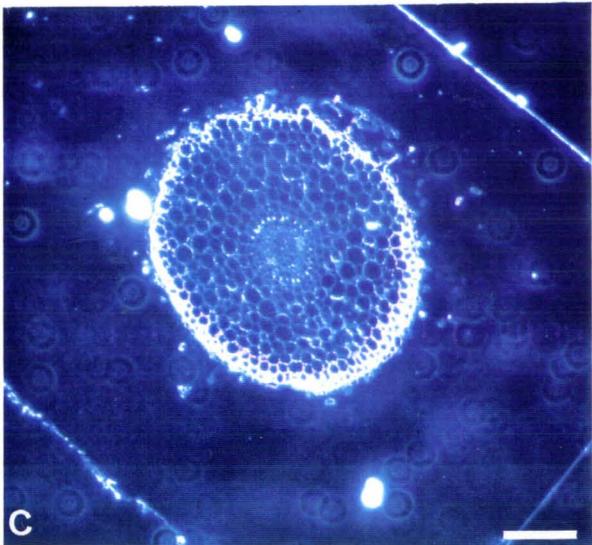
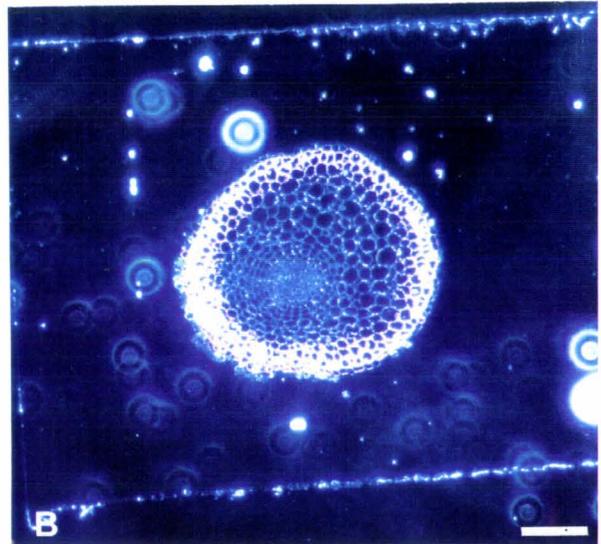
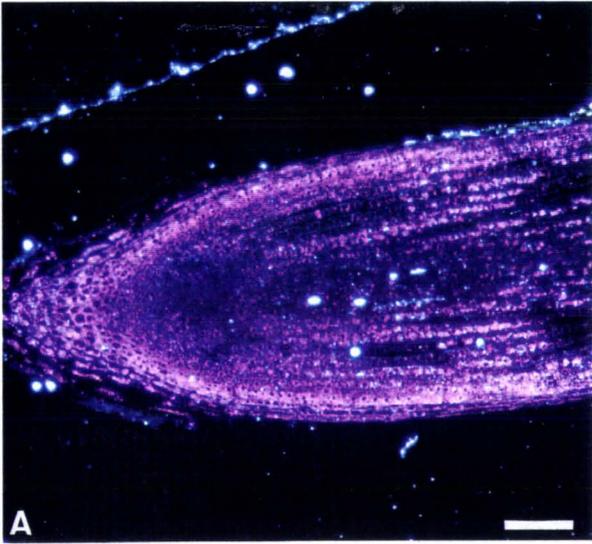


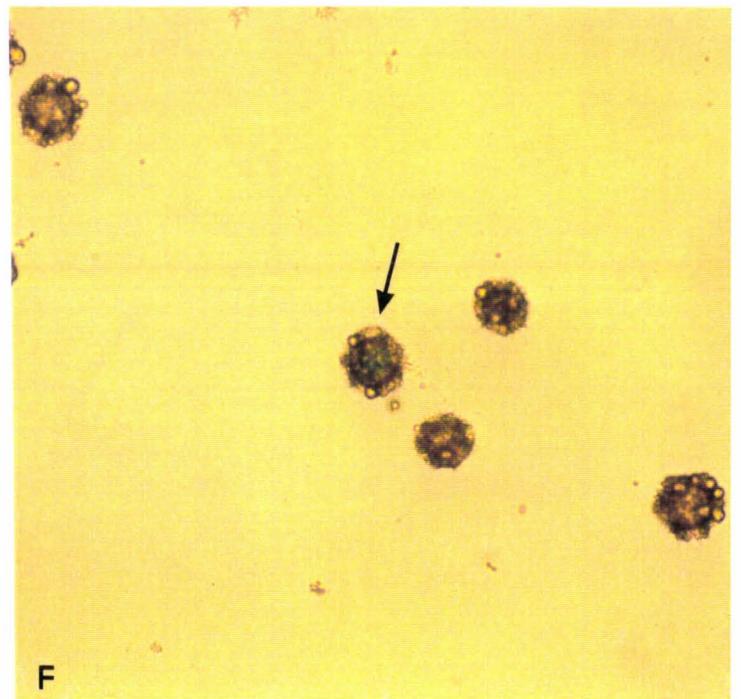
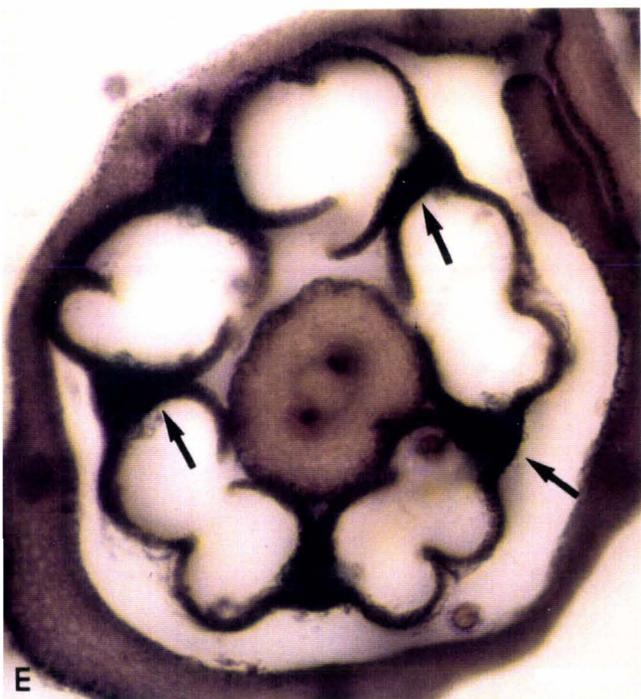
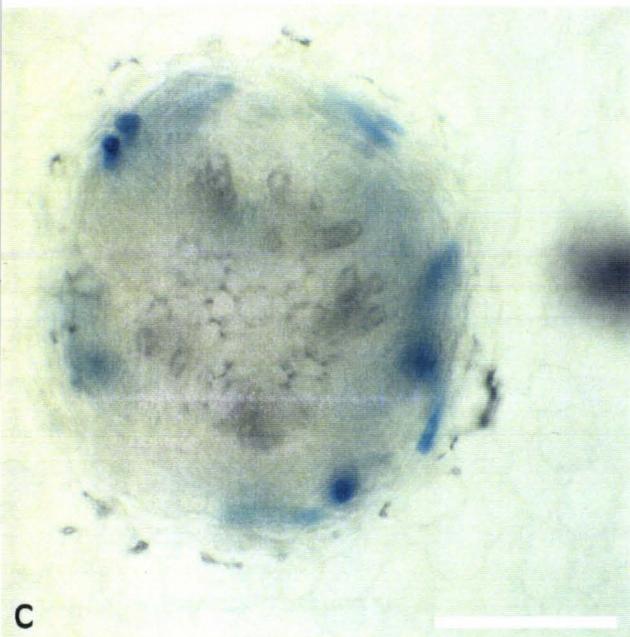
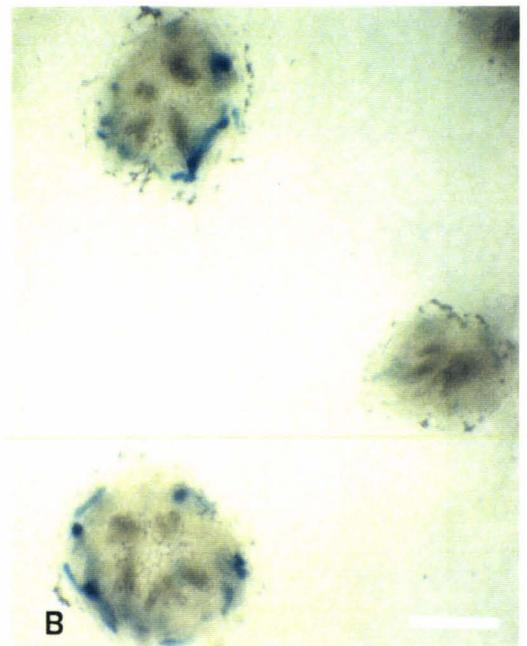
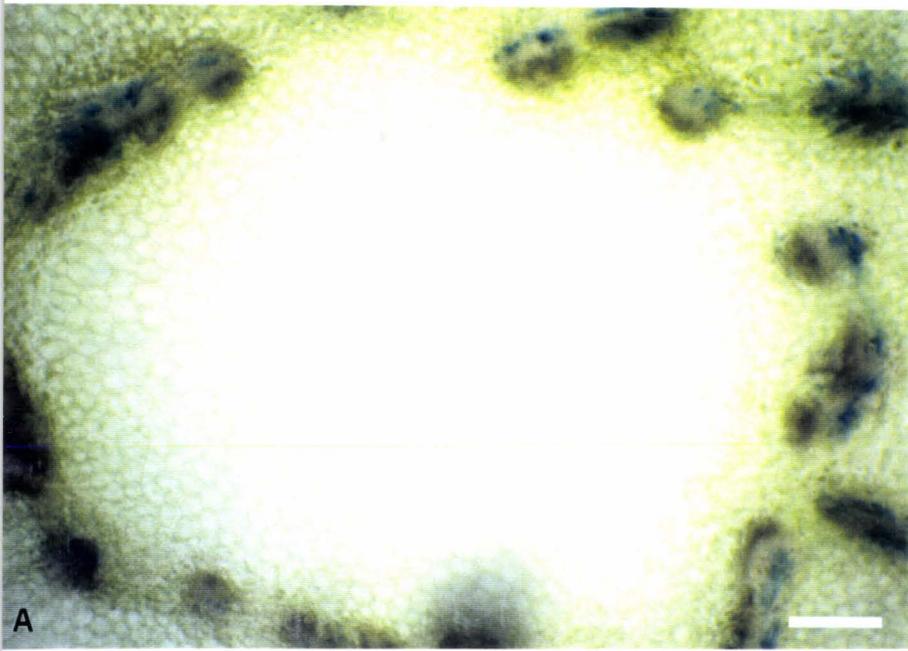
PLANCHE 9

Expression du gène *uidA* placé derrière le promoteur TR2' dans le bouton floral

Activité GUS est présente dans le tissu vasculaire du receptacle floral (A), de l'ovaire (B) et (C), de l'ovule (D) et des anthères (E) (flèches). Le gène *uidA* s'exprime très faiblement dans le pollen (F).

(C) correspond à un agrandissement des tissus vasculaires de l'ovaire en (B).

Barre = 100 μm



d- Activité GUS dans la graine

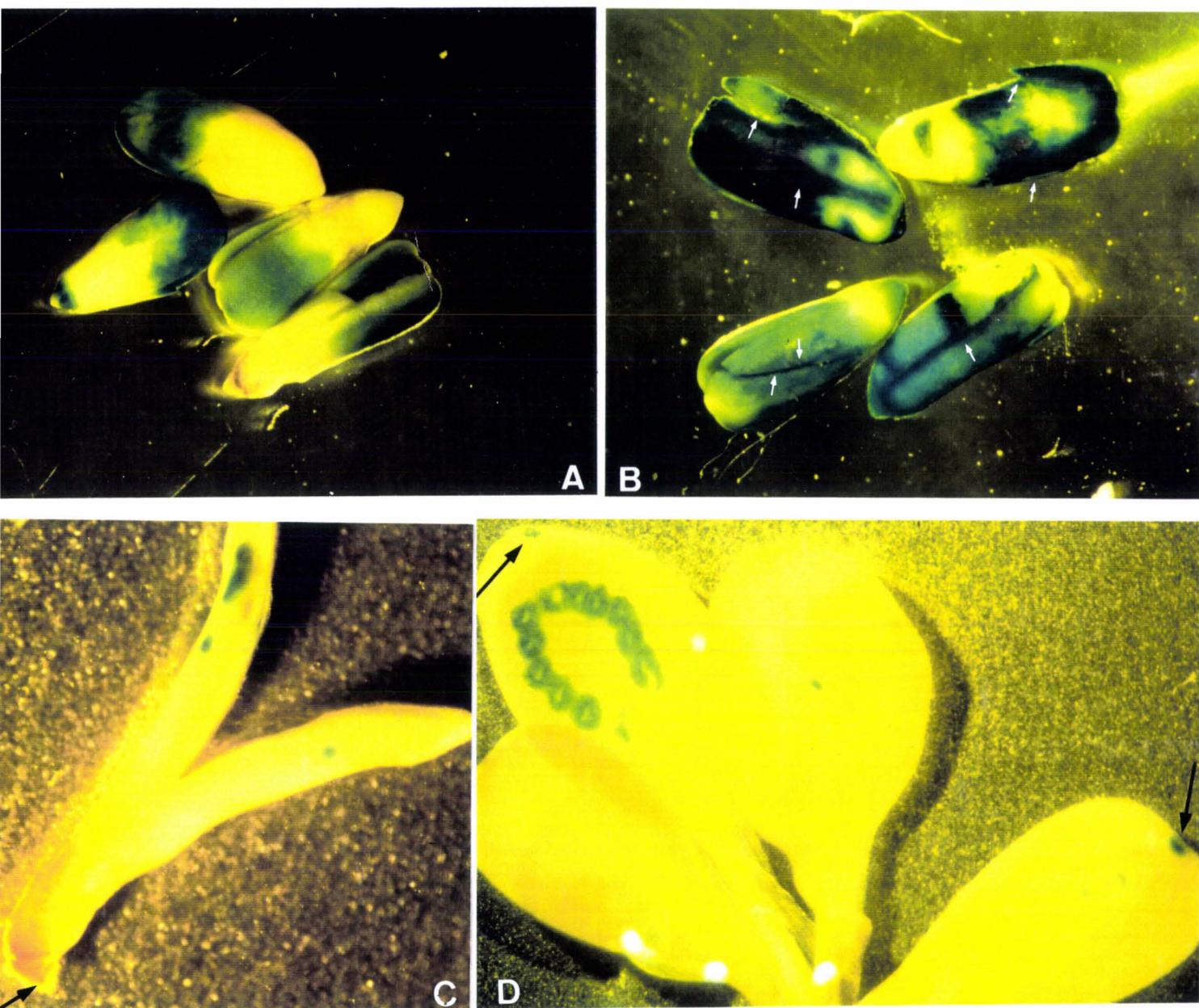
La transformation de l'ovule en graine par fécondation comporte le développement de l'embryon, l'accumulation de réserves dans l'albumen et l'épaississement des téguments. La croissance de l'albumen se fait aux dépens du nucelle qui se résorbe peu à peu, si bien que dans la graine mûre, l'albumen arrive au contact direct des téguments. Il est représenté par une très fine couche qui entoure l'embryon. La graine est dite exalbuminée. Des embryons de plantes transgéniques ont été analysés pour l'expression du gène *uidA*. Des graines de plantes transgéniques ont été décortiquées, les embryons ont été récupérés et placés dans le tampon de réaction en présence du X-GLUC. Les résultats (planche 10A) montrent que l'activité β -glucuronidase est présente dans la fine couche cellulaire de l'albumen, dans les cotylédons et parfois elle est présente dans la racine.

Des blessures effectuées sur ces embryons induisent le promoteur TR et l'expression est très intense aux endroits de blessures (planche 10 B).

Afin de vérifier l'expression du gène *uidA* dans la descendance, des graines sont mises à germer sur le milieu H₂O. Le test GUS est effectué à un stade très précoce du développement (stade cotylédon et stade deux feuilles).

Les résultats (planche 10C, 10D) montrent un changement de l'activité de la β -glucuronidase au cours du développement de la plantule. En effet, dans les toutes jeunes plantules (stade cotylédons), l'expression se traduit par des taches réparties sur toute la surface des cotylédons alors que dans la racine, elle est localisée dans la partie apicale (planche 10C). Au stade deux feuilles, l'activité GUS se manifeste par un point bleu à l'extrémité des feuilles et elle est presque absente dans les cotylédons. Des blessures effectuées sur les feuilles et sur les cotylédons montrent une activité GUS aux points de blessures (planche 10D). Dans les racines, l'expression est très intense dans l'apex. Plus les feuilles sont âgées, plus l'expression est localisée sur toute la surface foliaire et particulièrement au niveau des vaisseaux (planche 8E).

Planche 10



Expression de la β -glucuronidase dans les embryons et dans les plantules issues de la transformation par la souche TR2'-*uidA*.

Expression au niveau des embryons intacts (A) et incisés (B) appartenant aux plantes transgéniques.

(C) : Activité GUS sous forme de "spots" dans une jeune plantule.

(D) : Activité GUS aux points de blessure des feuilles et des cotylédons d'une jeune plantule. Les flèches indiquent l'expression obtenue sans blessure.

Conclusion

L'étude de l'expression du gène *uidA* contrôlée par le promoteur TR2' a montré que le gène s'exprime différemment dans les tissus de la chicorée. Dans les feuilles, tous les types cellulaires expriment ce gène alors que dans les racines, l'activité β -glucuronidase se trouve surtout localisée dans les méristèmes et dans les cellules externes du cortex racinaire. Dans la fleur, l'expression est limitée au tissu vasculaire. L'activité de la β -glucuronidase est transmise dans la descendance et elle met en évidence la régulation du promoteur TR. En effet, un changement de l'expression du gène *uidA* est observé en fonction du stade de développement des plantules. L'expression est présente dans les jeunes cotylédons et elle disparaît au cours de leur développement. Inversement l'expression est intense chez les feuilles âgées alors qu'elle est représentée par une tache à l'extrémité des jeunes feuilles. Par ailleurs, le test histochimique met en évidence chez la chicorée, l'induction du promoteur TR2' par des blessures.

5-2 Test spectrofluorimétrique

La quantification de l'expression du gène *uidA* chez les plantes transformées est réalisée par un spectrofluorimètre en utilisant le substrat MUG. La fluorescence est mesurée avec une excitation à 365 nm et à une émission à 455 nm. La concentration protéique est exprimée en mg équivalent de sérum albumine bovine et la fluorescence est exprimée en nM de MU formé par minute et par milligramme de protéine (nmole 4-MU min⁻¹ mg⁻¹ de protéine). Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Plantes testées	Activité en nmole 4-MU min ⁻¹ mg ⁻¹ de protéine
Témoin non transformé	51
Plante 8	2516
Plante 9	1390

Tableau 18 : Activité GUS de deux plantes pGSGluc1 mesurée par spectrofluorimétrie (l'activité GUS correspond à l'activité moyenne de 2 essais indépendants effectués sur le même échantillon).

La méthode spectrofluorimétrique est très sensible et a mis en évidence dans le témoin non transformé une activité GUS de l'ordre de 51 nM de MU formé par minute et par milligramme de protéine. Cette activité est considérée par certains auteurs, comme étant un bruit de fond lié à la méthode de dosage ou due à une activité endogène (Alwen *et al.*, 1992).

Une variation d'activité GUS existe parmi les transformants. En effet, la plante 8 montre une expression du gène *uidA* élevée comparée à la plante 9. Cette variation peut être due au fait que les deux plantes sont issues de deux événements de transformation différents. Ainsi, chaque plante est génétiquement unique.

a- Effet des blessures sur l'induction du promoteur TR'2 chez la chicorée.

Nous avons voulu vérifier si chez les chicorées transformées, l'expression du gène *uidA* placé sous le contrôle du promoteur TR 2' est induite par des blessures. Ainsi nous avons pratiqué des lacérations sur les fragments foliaires et racinaires de la plante 9. Les fragments blessés sont mis en culture sur le milieu MS pendant 24 h. Le test fluorimétrique est effectué après 24 h d'incubation des explants et l'activité GUS est ramenée en nmole 4-Mu min⁻¹ mg⁻¹ de protéine. Les résultats sont présentés dans suivant.

	Activité GUS en nmole 4-MU min ⁻¹ mg ⁻¹ de protéine	
	Feuilles	Racines
Témoin non transformé	174	104
Transformant non blessé	1390	131
Transformant blessé	8518	3500

Tableau 19 : Mesure fluorimétrique effectuée 24 h après blessure de feuilles et de racines de la plante 9 transformée par la souche pGSGLUC1 (l'activité GUS correspond à l'activité moyenne de 2 essais indépendants effectués sur le même échantillon).

Chez le transformant non blessé, l'activité GUS est essentiellement localisée dans les feuilles. A l'issue de la blessure, l'expression est augmentée dans les racines. En effet, la blessure entraîne une augmentation de l'expression du gène *uidA* 27 fois par rapport au transformant non traité. Dans les feuilles, l'expression est élevée de 6 fois.

Les résultats du test fluorimétrique confirment l'analyse histochimique dans les feuilles de la chicorée (planche 10D). En effet, des piqûres effectuées sur la surface foliaire induisent une activité GUS aux points de blessures. Cette réponse des feuilles aux blessures pourrait impliquer la production des phytoalexines comme produit de défense à l'attaque, ce qui induira le promoteur TR2'.

b- Effet des régulateurs de croissance sur l'induction du promoteur TR2' chez la chicorée

Nous avons voulu vérifier si chez la chicorée transformée, le promoteur TR 2' est induit par des phytohormones. Des fragments de feuilles et de racines de la plante 9 sont mis sur le milieu de MS contenant un régulateur de croissance. Nous avons utilisé cinq régulateurs de croissance : 2,4-D, AIA, BAP, GA₃ et ABA, tous testés à une concentration de 10 mg.l⁻¹ (Saito *et al.*, 1990). L'incubation en présence de ces phytohormones a durée 24 h. L'activité GUS est rapportée en nmole 4-Mu min⁻¹ mg⁻¹ de protéine. Les résultats sont présentés dans les tableaux 20 pour les feuilles et 21 pour les racines.

-Feuilles

	Activité GUS en nmole 4-MU min ⁻¹ mg ⁻¹ de protéine
Témoin non transformé	174
Transformé non traité	1390
2,4-D	16684
AIA	2500
BAP	1622
GA ₃	1418
ABA	3550

Tableau 20 : Mesure fluorimétrique effectuée 24 h après le traitement des feuilles de la plante 9 avec l'un des régulateurs de croissance (l'activité GUS correspond à l'activité moyenne de 2 essais indépendants effectués sur le même échantillon).

L'expression du gène *uidA* est remarquablement augmentée par le 2,4-D. En effet, l'action du 2,4-D, auxine synthétique, est multipliée par 12 par rapport au transformant non traité. Le 2,4-D est plus efficace sur l'induction du promoteur TR que l'AIA qui n'accroît que d'environ 2 fois l'expression du gène *uidA*. En ce qui concerne l'ABA, il n'augmente l'expression du gène *uidA* que de 2,5 fois par rapport au transformant non traité. L'effet des autres régulateurs de croissance (BAP est GA₃) est moindre sur l'expression du gène de la β-glucuronidase.

Les résultats du test fluorimétrique pourraient expliquer les analyses histochimiques. En effet, l'expression du gène *uidA* dans les feuilles et les boutons floraux se manifestent principalement dans les tissus conducteurs de la chicorée. Or, l'auxine fournie par l'appareil végétatif de la plante a une action histogène. Elle facilite la formation des tissus conducteurs (tubes criblés et vaisseaux). L'auxine pourra donc induire le promoteur TR2' dans ces lieux d'action. Par ailleurs, l'ABA s'accumule dans les cellules de garde ce qui pourrait expliquer l'expression observée dans ces cellules (résultats non inclus). Cependant, l'analyse histochimique n'a pas montré une expression accrue de GUS dans ces cellules.

- Racines

	Activité GUS en nmole 4-MU min ⁻¹ mg ⁻¹ de protéine
Témoin non transformé	104
Transformé non traité	131
2,4-D	1756
AIA	1470
GA ₃	1341
ABA	17708

Tableau 21 : Mesure fluorimétrique effectuée 24 h après traitement des racines de la plante 9 avec l'un des régulateurs de croissance (l'activité GUS correspond à l'activité moyenne de 2 essais indépendants effectués sur le même échantillon).

Dans les racines, l'activité de la β -glucuronidase est augmentée sous l'action des différents régulateurs utilisés. L'AG₃, l'AIA, le 2,4-D ont pratiquement le même effet sur l'induction du promoteur TR2'. Ils augmentent l'activité GUS de plus d'une dizaine de fois par rapport au transformant non traité. Quant à l'ABA, il entraîne une augmentation de 135 fois de l'activité GUS par rapport au transformé non traité. L'ABA joue un rôle déterminant dans l'induction du promoteur TR2'.

Les résultats du test fluorimétrique confirment l'analyse histochimique dans les racines de la chicorée. En effet, l'expression du gène de la β -glucuronidase sous le promoteur TR2' est localisée principalement dans l'apex de la racine. Or l'apex de la racine est un lieu d'accumulation de plusieurs hormones. Il a été montré que l'acide abscissique est synthétisé principalement dans la racine et que l'auxine s'y accumule. De plus, l'auxine stimule les cellules de la zone d'élongation. Ces régulateurs de croissance pourraient être responsables de l'expression du gène *uidA* dans l'apex de la racine.

Par ailleurs, il semblerait qu'il y a une relation entre l'ABA et les blessures sur l'induction du promoteur TR2'. En effet, hormone de détresse, l'ABA est impliqué dans la

transmission d'un signal qui amène la plante à prendre des dispositions de défense à l'égard des agressions. Dans ce sens, des blessures de feuilles ou de racines conduisent à une augmentation du taux endogène d'ABA si bien qu'il induira le promoteur TR.

c- Conclusion

Les essais quantitatifs et histochimiques démontrent que le promoteur TR2' est induit par des blessures et par des régulateurs de croissance dans les feuilles et les racines de chicorée. Ces résultats confirment ceux de Langridge *et al.* (1989) et de Saito *et al.* (1990) chez le tabac contenant le gène *uidA* sous le promoteur TR2'. De plus, l'expression est différente selon le stade de développement de la chicorée. Ainsi, le promoteur TR2' est constitué de sous-domaines qui répondent à des signaux hormonaux et environnementaux. Par ailleurs, les éléments de régulation du TR2'-*uidA* peuvent être considérés comme constitutifs dans le sens qu'elles s'expriment presque dans tous les organes, mais le taux de l'expression dépend fortement du stade de développement de la plante et de l'organe testé.

6. Activité du gène *uidA* dans les plantes transformées par la souche pTDE4

Dans les plantes transformées par la souche pTDE4, le gène *uidA* est sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV. L'activité de la β -glucuronidase est analysée par colorimétrie et par fluorimétrie.

6-1 Analyse histochimique

a - Activité GUS dans les racines

Les résultats de l'expression du gène *uidA* contrôlé par ce promoteur montrent que l'activité GUS dans les racines varie selon l'âge des plantes transgéniques. Les jeunes racines jeunes (3 à 4 semaines) présentent une activité GUS dans la stèle, dans la coiffe, dans la région méristématique et dans les cellules corticales (planche 11C). Les racines âgées (plus de deux

PLANCHE 11

Expression du gène *uidA* placé derrière le promoteur 35S dans les racines de chicorée.

Sur une racine adulte, l'activité GUS est présente dans le cortex et dans l'épiderme (A), (B) et (D). On note son absence dans les tissus vasculaires. L'écrasement d'une racine confirme l'absence de l'expression dans la stèle (D). Lorsque la racine est jeune, l'expression est généralisée dans tous les tissus (C).

L'observation des coupes transversales révèlent une activité dans tous les tissus de la racine (E) et (F).

(F) correspond à l'agrandissement de la photo (E) au niveau du tissu vasculaire.

Barre = 100 µm pour A, B, C et D et 10 µm pour E et F.

Planche 11

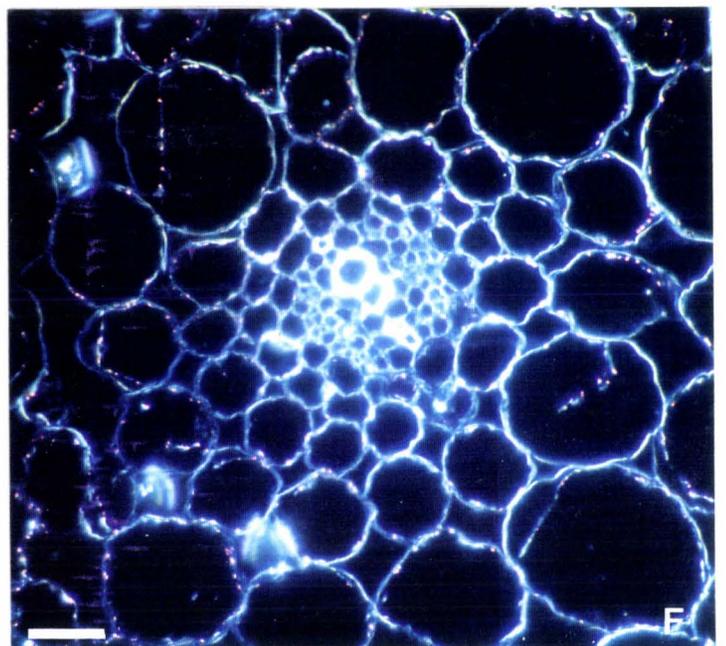
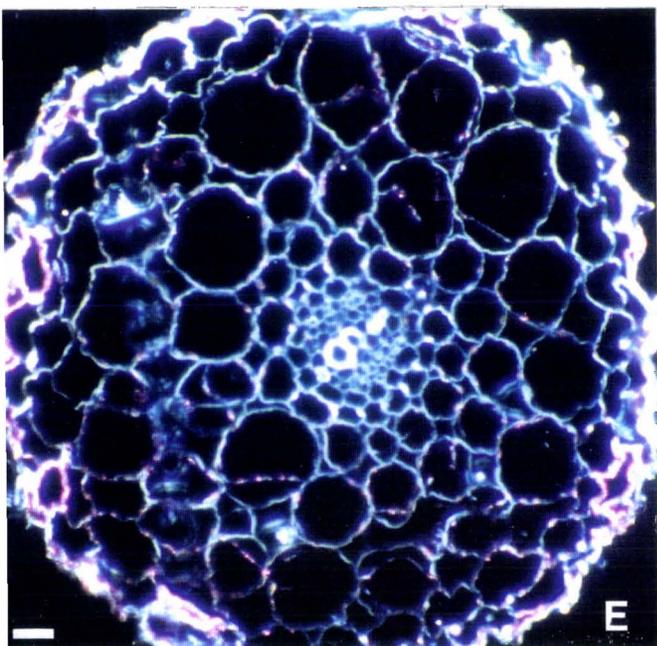
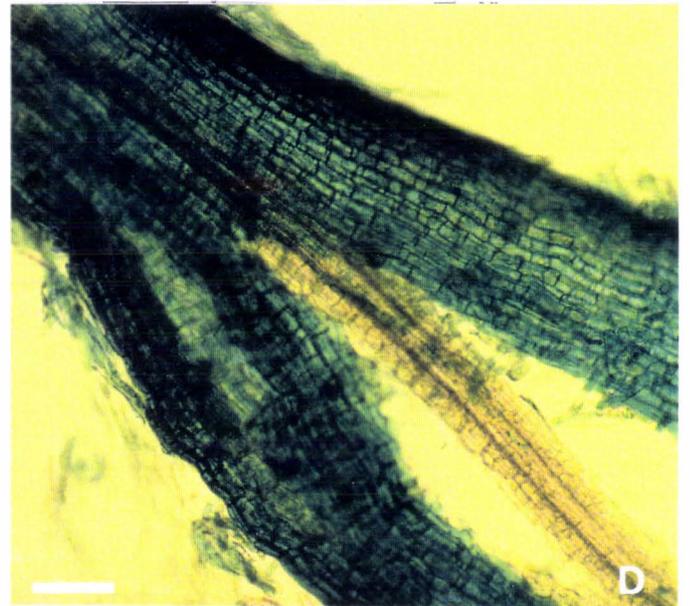
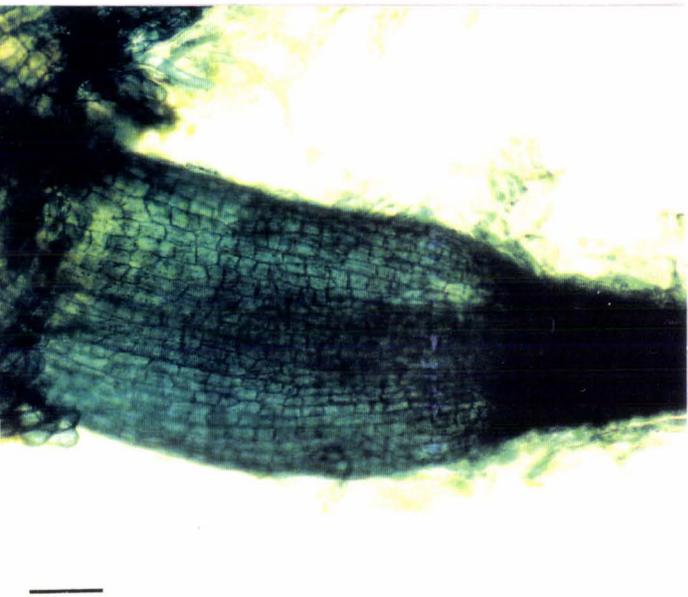
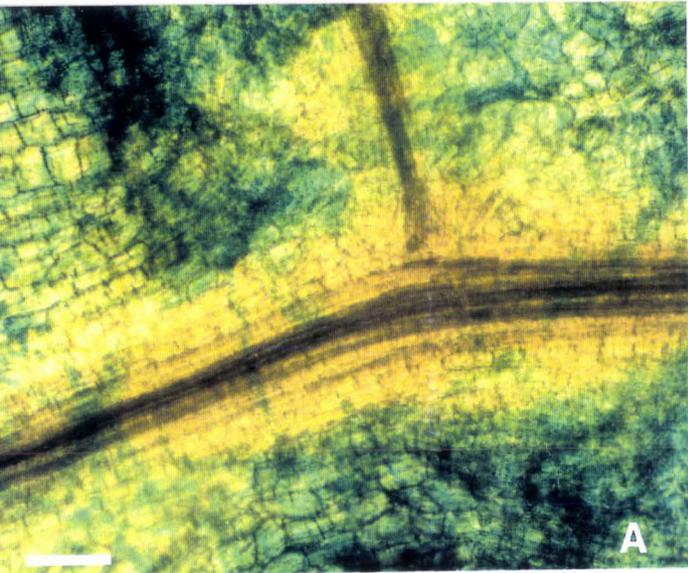
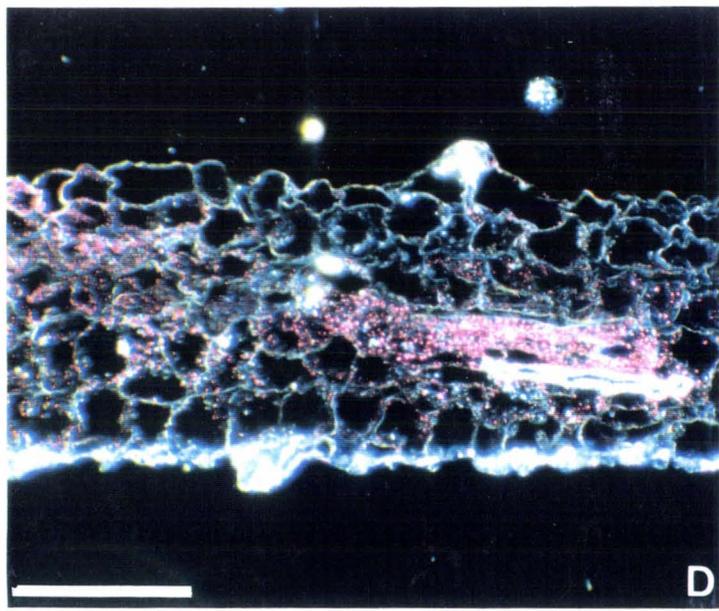
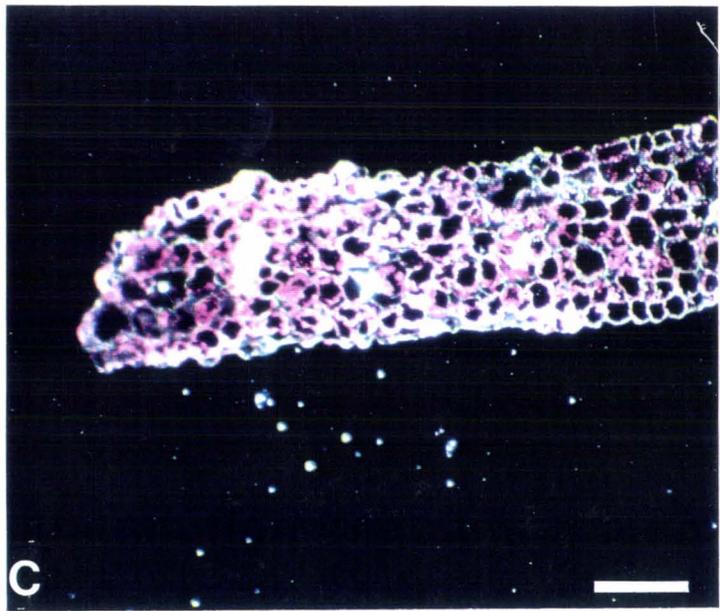
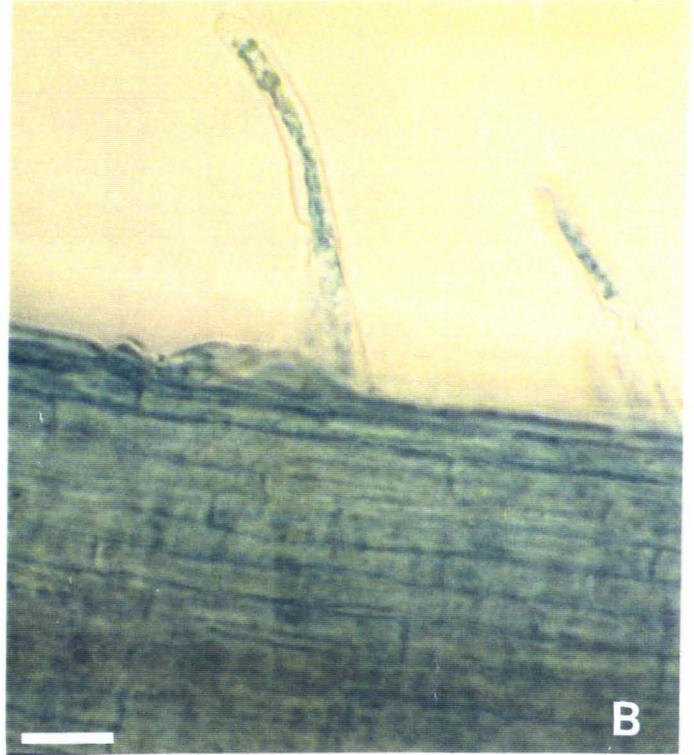


PLANCHE 12



Expression du gène *uidA* placé derrière le promoteur 35 S CaMV dans la racine, figures (A) et (B) et dans la feuille, figures (C) et (D).

L'activité GUS est présente dans le cytoplasme, après écrasement des tissus de la racine (A) et dans les poils absorbants de la racine (B). Barre = 10 μm .

Dans les feuilles, l'activité GUS est présente dans les cellules du mésophyle (C) et dans les tissus vasculaires (D). Barre = 100 μm .

mois) ne présentent pas d'expression dans la stèle (11A, 11D), dans les régions d'élongation et dans la région méristématique (planche 11B, 11E, 11F).

Afin de mettre en évidence l'activité GUS au niveau cellulaire, des fragments racinaires ont subi une plasmolyse en présence de 1M de saccharose, l'observation microscopique des cellules du poil absorbant montrent après ce traitement que l'activité GUS est cytoplasmique (planche 12B). De même, l'écrasement d'une racine a permis d'avoir des cellules isolées qui mettent en évidence l'activité β -glucuronidase dans le cytoplasme (planche 12A). Ce résultat rejoint celui de Franklin *et al.* (1993) sur le haricot.

b - Activité GUS dans les feuilles

Dans les feuilles, l'activité GUS est détectée dans les cellules du mésophylle, dans les tissus vasculaires (planche 12C, planche 12D) et dans les trichomes. L'activité GUS est aussi présente dans les cellules stomatiques. Par ailleurs, l'expression est beaucoup plus intense dans les feuilles âgées que dans les feuilles jeunes.

c- Activité GUS dans le capitule

Des coupes de 100 μ m sont réalisées sur le bouton floral de la chicorée à l'aide d'un vibratome. Les résultats montrent une activité β -glucuronidase dans les tissus vasculaires du réceptacle floral et des différentes pièces florales (planche 13A, 13B). Par ailleurs, dans le parenchyme floral, l'expression est absente (planche 13A). Les coupes qui passent au niveau de l'ovule non fécondé montrent une activité β -glucuronidase dans le sac embryonnaire, le nucelle, les tissus vasculaires qui traversent la paroi ovarienne (qui correspondent aux deux faisceaux du style et à celui destiné pour la ligule) et le faisceau du raphé (planche 13C, 13D). Le raphé est le prolongement du funicule.

Une hétérogénéité d'expression du gène *uidA* est observée au sein d'une même fleur. En effet, le tissu vasculaire du filet des étamines montre une variation d'intensité d'expression GUS au sein des fleurs (planche 13E, 13F et 13G) ; cette variation est illustrée dans la planche 13H.

PLANCHE 13

Expression du gène *uidA*, placé derrière le promoteur 35S, dans les fleurs

Figure **A-F** : activité GUS dans les tissus floraux. L'expression est présente dans les tissus vasculaires du réceptacle floral (**A**), dans les tissus ovulaire (**B**) et (**C**), dans les tissus vasculaires de l'ovule (v), dans le nucelle (n) et dans le sac embryonnaire (s) (**D**), dans les tissus vasculaires des filets des anthères (flèches) (**E**) et dans les anthères qui s'individualisent (flèches) (**F**).

Barre = 100 μm pour A, B, D, E et 1 mm pour C et F.

Variation de l'expression du gène *uidA* dans un même capitule

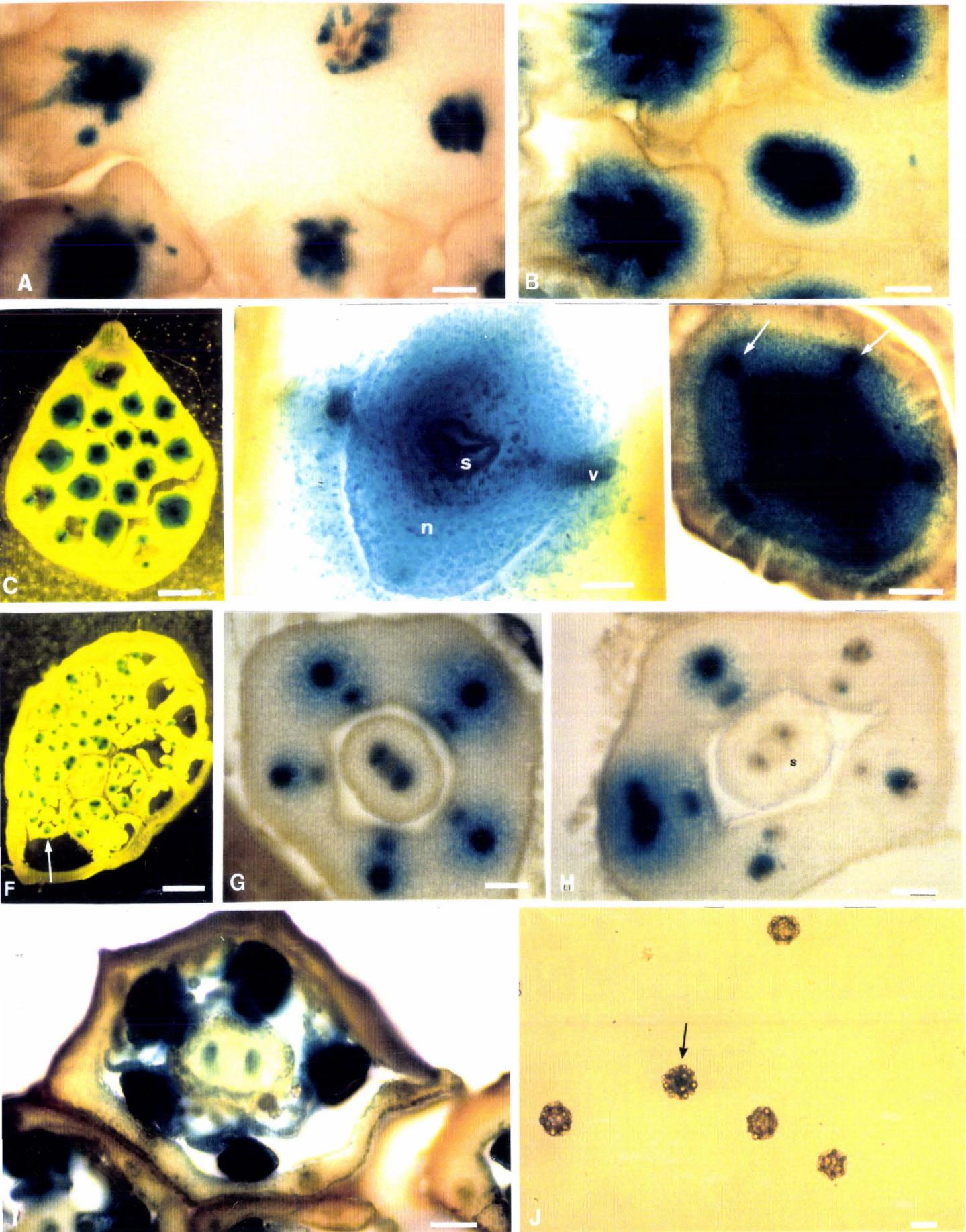
G : Activité GUS dans les tissus vasculaires des anthères et du stigmate

H : Les tissus vasculaires des stigmates ainsi que ceux de certaines anthères ne manifestent pas d'activité β -glucuronidase.

I : Les anthères bien individualisées et de section circulaire expriment le gène *uidA*

J : Seuls quelques grains de pollen (flèche) montrent une activité GUS.

Barre = 100 μm pour G, H, I et 20 μm pour J.



Une coupe transversale au niveau du manchon staminal met en évidence, pour chaque anthère, les quatre loges polliniques de section circulaire. L'assise des sacs polliniques est constituée d'un épiderme, d'une assise mécanique et d'une assise nourricière. Les cellules de la paroi (planche 13I), le tissu vasculaire de l'étamine et des stigmates expriment le gène *uidA*. L'activité du promoteur 35S CaMV est faible dans les tissus vasculaires des ligules où elle est surtout présente dans le méristème terminal (planche 14A).

L'analyse histochimique des grains de pollen montre une très faible expression du gène *uidA* (planche 13J). En effet, comme pour le promoteur TR2', 1% du pollen exprime le gène de la β -glucuronidase. On avait pensé que cette faible expression pourrait être due à la structure du grain de pollen ; le grain de pollen est entouré par deux parois, l'intine et l'exine. L'exine étant extérieure, est souvent ornée d'aspérités formant des réseaux. Ainsi, l'absence dans 99% des cas de l'expression du gène *uidA* dans le pollen pourrait être due à une difficulté d'infiltration du substrat X-GLUC à travers les deux membranes du pollen. Nous avons alors ajouté au tampon de réaction du Triton X-100 (Sigma) à 0,1% (Carpenter *et al.*, 1992), agent mouillant facilitant la pénétration du substrat X-GLUC. Malgré ce traitement, aucune augmentation du nombre de grains de pollen exprimant le gène *uidA* n'a été observée. Nous avons alors examiné l'expression du gène *uidA* sur des tétraspores et sur des microspores où la membrane n'est pas encore imprégnée de cutine. Seules quelques cellules expriment le gène *uidA*, mais nous n'avons pas décelé d'augmentation du nombre de tétraspores exprimant le gène *uidA*. Le promoteur 35S CaMV s'exprime très faiblement dans le pollen.

L'analyse histochimique des embryons issus des graines décortiquées de plantes transgéniques a révélé une activité de la β -glucuronidase dans la fine couche de l'albumen (planche 14B), dans les cotylédons et dans la racine de l'embryon. Cependant, une variabilité d'expression entre les différentes plantes transgéniques est décelée chez l'embryon :

- chez la **plante 1**, l'activité GUS est localisée dans les cotylédons et dans le pôle racinaire (planche 14D). Cependant au sein de cette même plante, l'expression est variable entre les embryons. En effet, chez certains embryons l'apex de la racine ne présente pas toujours une activité β -glucuronidase.

- chez la **plante 4**, l'expression est présente soit dans tout l'embryon, soit uniquement au niveau des cotylédons et/ou au pôle racinaire (planche 14E).

- chez la **plante 7**, l'activité GUS est représentée par des taches sur les cotylédons; elle est absente dans le pôle racinaire (planche 14C).

L'analyse de l'expression du gène *uidA* a été suivie dans les différentes étapes de la germination des plantes de la génération F1, en particulier dans la descendance de la plante 4. Chez les jeunes plantules (stade cotylédon), l'expression est localisée dans l'apex de la racine et au niveau du collet. A un stade plus avancé (stade une ou plusieurs feuilles) l'expression se manifeste dans les cotylédons ; par contre elle est absente dans la première feuille qui émerge. Plus les feuilles sont âgées, plus l'expression est intense (planche 14F).

d- Conclusion

La transformation de la chicorée par la souche pTDE4 montre une variation de l'expression du gène *uidA*.

Bien que le promoteur 35S utilisé dans cette construction soit considéré comme constitutif (Odell *et al.*, 1985), on constate une expression faible voire inexistante dans le pollen de la chicorée. De plus, l'activité est absente dans les tissus des anthères adultes ainsi que dans le méristème apical et la stèle des racines âgées. Inversement les feuilles âgées manifestent une expression plus importante du gène *uidA* que les feuilles jeunes.

Le promoteur 35S est donc régulé différemment en fonction du stade de développement de la chicorée.

PLANCHE 14

Activité GUS dans la ligule, les embryons et quelques plantule de la génération F1 des plantes transformées par la souche 35S CaMV-*uidA*

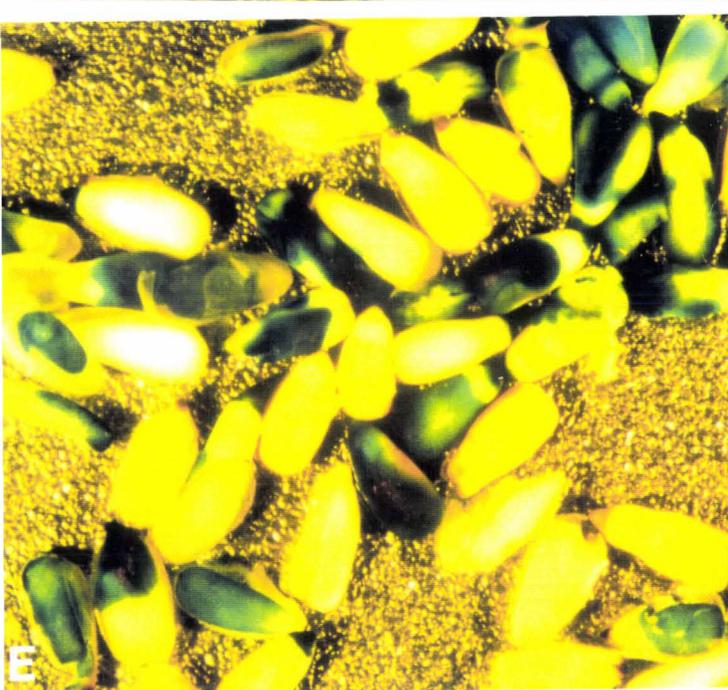
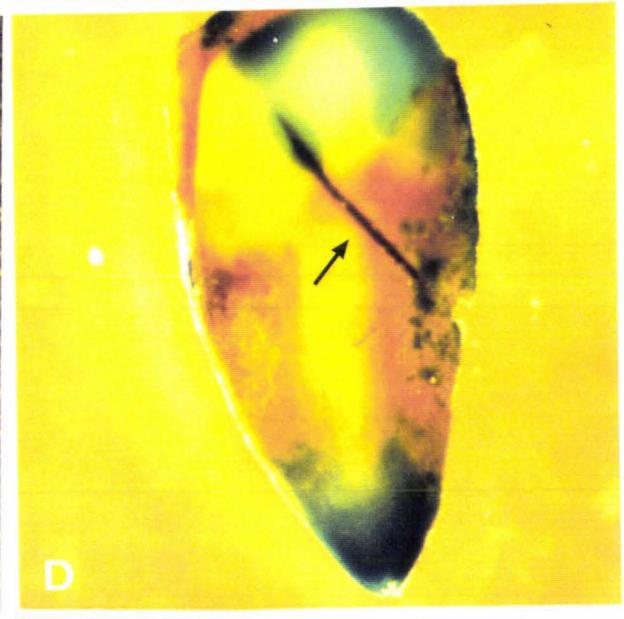
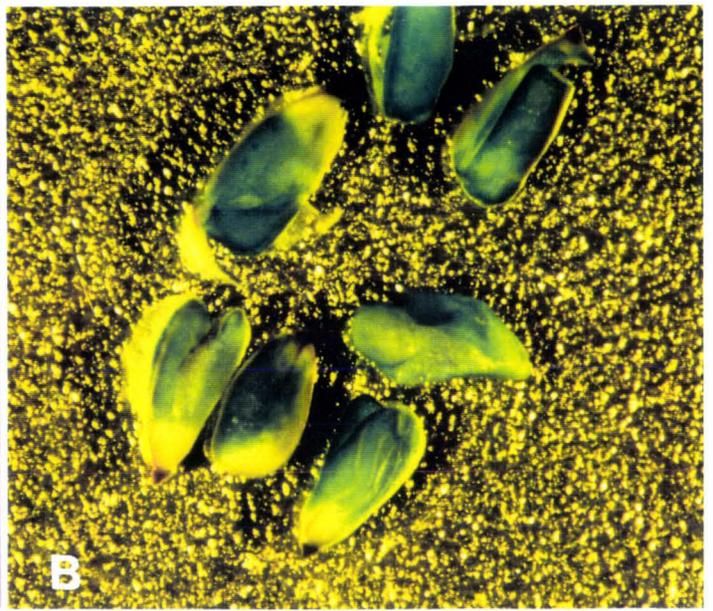
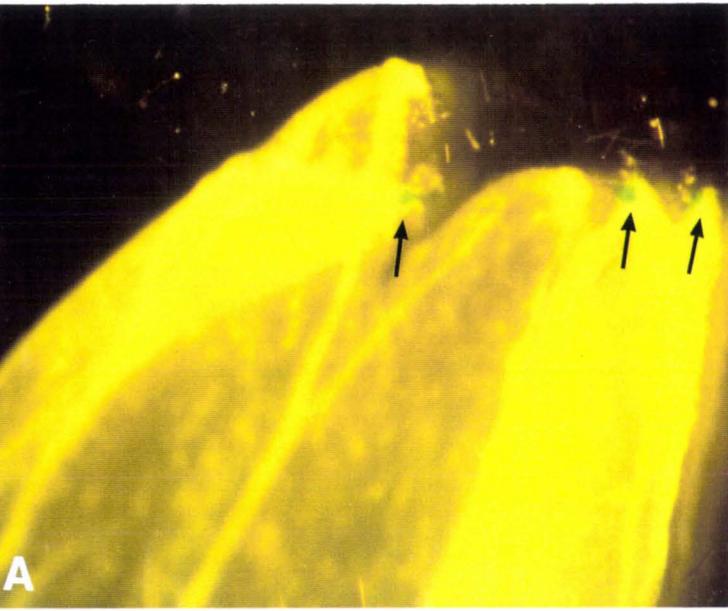
(A) : Les zones méristématiques de la ligule (flèches) montrent une expression GUS.

(B) : Le reste de l'albumen exprime le gène *uidA*.

(C), (D) et (E) : Activité GUS dans les embryons de différentes plantes.

(F) : Activité GUS dans différents de développement de plantules de la génération F1. L'activité GUS est essentiellement localisée dans les feuilles.

Planche 14



6-2 Mesure spectrofluorimétrique

La quantification de l'expression du gène *uidA* chez six plantes transformées par la souche pTDE4 est réalisée en utilisant le substrat MUG. La fluorescence est exprimée en nmoles de MU formé par minute et par milligramme de protéine. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Plantes analysées	Activité GUS en nmole 4-MU min ⁻¹ mg ⁻¹ de protéine
Témoin non transformé	3
Plantes transformées	
1	23
2	180
3	4400
4	710
6	1600
7	110

Tableau 22 : Activité GUS mesurée par spectrofluorimétrie dans les plantes transformées par la souche pTDE4 (l'activité GUS correspond à l'activité moyenne de 2 essais indépendants effectués sur le même échantillon).

La quantification de l'expression du gène *uidA* est différente entre les transformants. On constate que l'expression chez la plante 3 est la plus élevée. Elle est 190 fois plus élevée que celle de la plante 1 qui présente la plus faible activité.

Cette variation d'activité de la β -glucuronidase est fonction de l'événement de transformation. Pour de nombreux auteurs, les différences d'expression sont dues au nombre de copies insérées dans le génome et à la position de l'intégration (Shirsat *et al.*, 1989 ; Hobbs *et al.*, 1990 ; Peach et Velten, 1991).

L'induction de l'expression du gène *uidA* par des blessures ou par des régulateurs de croissance est étudiée sur la plante 4. Des fragments de feuilles ou de racines sont blessés ou traités par le 2,4-D ou l'ABA. L'incubation de ces fragments blessés ou traités avec ces hormones a duré 24 h. L'activité GUS est ensuite mesurée sur fluorimètre est rapportée en nmole de 4-Mu min⁻¹ mg⁻¹ de protéine. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Activité GUS en nmole 4-MU min ⁻¹ mg ⁻¹ de protéine		
	Feuilles	Racines
Témoin	33	15
Transformé non traité	710	425
Blessé	815	350
2,4-D	1095	630
ABA	657	470

Tableau 23 : Mesure fluorimétrique effectuée sur la plante 4 transformée par la souche pTDE4.

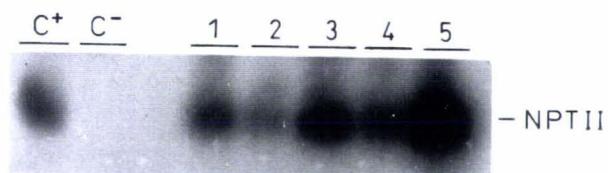
On constate que l'expression du gène *uidA* est plus importante dans les feuilles que dans les racines. Le 2,4-D augmente l'activité de la β -glucuronidase dans les feuilles et racines de 1,5 fois par rapport au transformé non traité. Les blessures et l'ABA n'ont pas d'effet sur l'induction du promoteur 35S comparé au promoteur TR2'.

7. Expression de la néomycine phosphotransférase II

Nous avons cherché à vérifier l'expression du gène *nptII* dans des plantes transformées par les constructions pGSGLUC1 et pTDE4.

La concentration en protéines dans des plantes transformées, des plantes non transformées (C⁻) et d'une plante témoin positive (C⁺ : tabac transgénique contenant le gène *nptII*) sont déterminées par la méthode de Bradford, (1976). Des quantités identiques de protéines sont déposées sur un gel de polyacrylamide non-dénaturant (PAGE) et soumises à l'électrophorèse. Les protéines sont ensuite transférées sur papier Whatman P81 sur lequel la réaction *in situ* a eu lieu en présence de kanamycine et du γ ³²P-ATP. Après lavage, le papier P81 est mis en contact avec un film Kodak (X-OMAT) pendant une nuit pour réaliser une autoradiographie.

PLANCHE 15



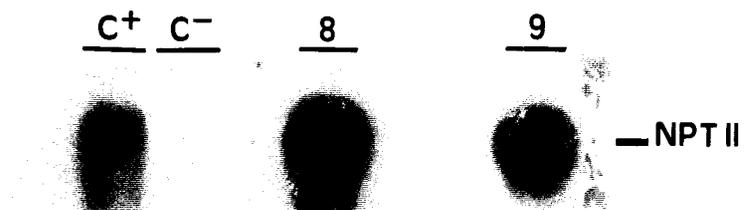
Test NPTII sur des chicorées transgéniques résistantes à la kanamycine

C⁺ : contrôle positif (tabac transformé).

C⁻ : bourgeon non transformé.

1, 2, 3, 4 et 5 : extrait protéiques provenant de bourgeons transformés avec la souche pTDE4.

PLANCHE 16



Test NPTII sur des chicorées transgéniques résistantes à la kanamycine

C⁺ : contrôle positif (tabac transformé).

C⁻ : bourgeon non transformé.

8 et 9 : extraits protéiques provenant de bourgeons transformés par la souche pGSG LUC1.

Les résultats (planche 15 et 16) montrent que le témoin non transformé ne présente aucun signal positif comparé au tabac transformé qui sert de témoin. Les plantes 1, 2, 3, 4 et 5 transformées par la souche pTDE4 (planche 15) et les plantes 8 et 9 transformées par la souche pGSGLUC1 (planche 16) présentent toutes une activité NPTII. Cependant, avec la souche pTDE4 on note une variabilité d'activité selon les transformants. Cette variabilité peut avoir diverses origines. Elle peut être due au nombre de copies intégrées dans le génome végétal, à des effets de position ou à des méthylations de copies. Toutefois, nos données montrent que le gène *nptII* a bien été transféré et intégré dans le génome et qu'il s'est exprimé dans les tissus de la chicorée.

8. Analyse moléculaire des plantes transformées

Afin de détecter la présence des transgènes ainsi que le nombre de copies de l'ADN-T intégrées dans le génome de la chicorée, différentes plantes ont été analysées par hybridation moléculaire.

L'ADN génomique de deux plantes (plantes 8 et 9) transformées par la souche pGSGLUC1 et de sept plantes (plantes 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7) transformées par la souche pTDE4 a été extrait et digéré par des enzymes de restriction. Deux sondes sont utilisées à cet effet. La sonde A constituée par un fragment de 1,2 Kb et la sonde B correspondant à un fragment de 1,5 Kb (Figure 13).

8-1 Caractérisation moléculaire des plantes transformées par la construction pTDE4

8-1-1 Hybridation avec la sonde uidA

L'ADN des plantes transformées par la construction pTDE4 a été digéré par l'enzyme de restriction *Hind* III. Cette enzyme coupe l'ADN-T en deux fragments : l'un comprend une partie du gène *uidA*, l'autre comprend le gène *nptII* (Figure 12).

L'ADN-T contient un seul site de restriction *Hind* III, le site suivant se trouve dans l'ADN flanquant de la plante. Nous cherchons à révéler l'insertion du gène *uidA* par hybridation de l'ADN des transformants avec la sonde *uidA*. Cette sonde est obtenue par digestion l'ADN-T

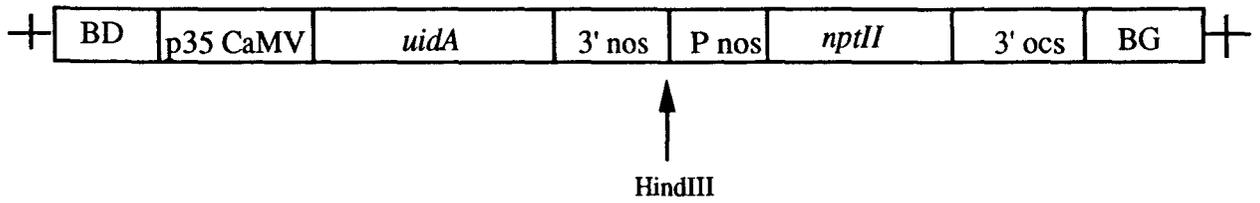


Figure 12 : Représentation schématique de l'ADN-T de la souche pTDE4.

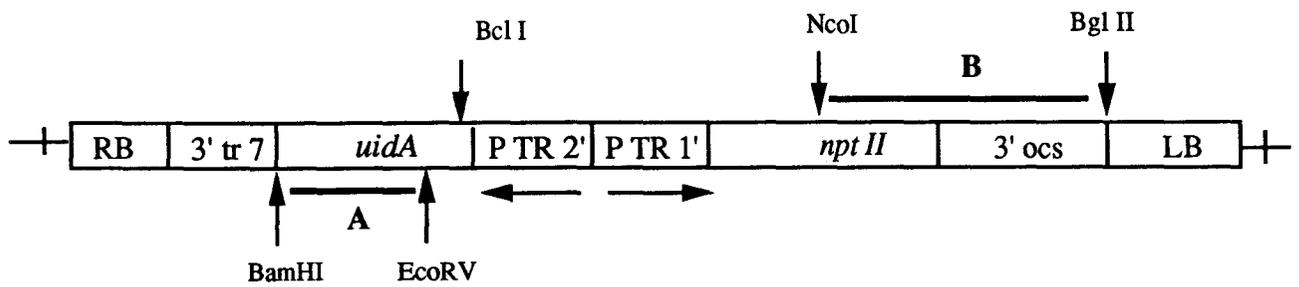


Figure 13 : Représentation schématique de l'ADN-T de la souche pGSGLUC1

du plasmide pGSGLOC1 par les enzymes *EcoR* V / *BamH* I (Figure 13). L'hybridation avec cette sonde devra nous permettre de révéler un ou plusieurs fragments des transgènes intégrés.

Les résultats montrent que l'ADN témoin (C⁻), extrait à partir de plante non transformé ne présente aucun signal d'hybridation. Le témoin positif constitué par le plasmide pGSGLOC1 non coupé montre des signaux d'hybridations de tailles variables qui correspondent aux différentes formes du vecteur pGSGLOC1 (le super enroulé, l'enroulé et le linéaire). Par ailleurs, pour les plantes transformées, un profil d'hybridation différent est obtenu avec l'apparition de fragments de taille différente (planche 17A). Les plantes 1 et 2 présentent trois fragments qui ont une taille de 11,5, 6 et 3 Kb. La position de ces copies est identique pour les deux plantes. La plantes 3 a deux copies de l'ADN-T situées 13 et à 7 Kb. La faible intensité de ces fragments est due à la faible quantité d'ADN déposée pour cette plante. La plante 4 a une copie à 10 Kb ; le fragment à 11,5 Kb de faible signal peut être le résultat d'une digestion partielle. La plante 5 et 6 ont chacune deux copies de l'ADN-T à 5 et à 7 Kb. La plante 7 possède une seule insertion du gène *uidA* située à 8 Kb.

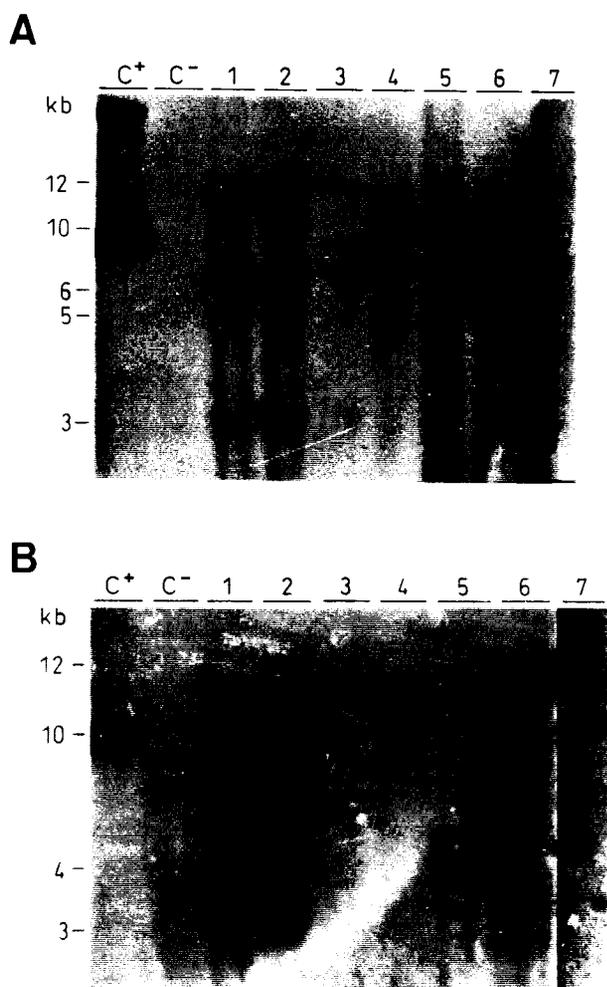
8-1-2 Hybridation avec la sonde *nptII*

Pour déterminer le nombre de copies du gène *nptIII* inséré dans le génome, la même membrane, utilisée déjà pour l'hybridation avec la sonde *uidA*, est incubée avec la sonde *nptII* issue d'une digestion de l'ADN-T du plasmide pGSGLOC1 par *Nco* I / *Bgl* II (Figure 13). Le profil d'hybridation montre l'existence d'une ou plusieurs copies du gène *nptIII* (planche 17B). Les plantes 3, 5, 6 et 7 ont un seul fragment qui montre une homologie avec la sonde *nptII*. Sa taille est variable selon la plante analysée. Chez la plante 3, elle est située à 12 Kb et aux environ de 5 Kb pour les autres plantes. Pour les plantes 5 et 6 l'insertion semble être identique pour les deux types d'hybridations. Ceci traduit qu'elles sont issues du même événement de transformation. La plante 1 possède 4 copies du gène *nptIII* . Elles sont situées à 11,5; 9; 3,5 et 3Kb. Enfin, cet hybridation révèle 5 fragments du gène *nptIII* pour la plante 2 (planche 17 B).

8-1-3 Conclusion

Le nombre de copies déterminé par les techniques d'hybridations avec les sondes *uidA* et *nptII* est résumé dans le tableau suivant.

PLANCHE 17



Analyse par Southern des plantes de chicorée transformées par la souche
pTDE4.

A : Hybridation avec la sonde *uidA*

B : Hybridation avec la sonde *nptII*

C⁺: témoin positif (plasmide pGSGLOC1)

C⁻: témoin non-transformé

1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 : plantes transformées.

Plantes transformées par pTDE4	Nombre de copie obtenu par la sonde uidA	Nombre de copie obtenu par la sonde nptII
1	3	4
2	3	5
3	2	1
4	2*	1
5	2	1
6	2	1
7	1	1

Tableau 24 : nombre de copies des gènes *uidA* et *nptII* des plantes transformées par la construction pTDE4.

* dont une copie peut être le produit d'une digestion partielle.

Les plantes analysées sont issues d'une transformation des explants cotylédonaire. Leur analyse moléculaire a mis en évidence la présence d'au moins une copie de chacun des gènes. Seule la plante 7 a un insert de chaque gène (*uidA* et *nptII*). La taille de ces inserts est différente suivant les sondes utilisées. Ceci suggère que la plante 7 a une copie complète de l'ADN-T.

Les plantes 3, 5 et 6 ont plus de copies du gène *uidA* que de copies du gène *nptII*. Elles ont deux copies d'ADN-T dont une aurait le gène *nptII* délété. La délétion du gène *nptII* aurait eu lieu soit au moment du transfert de l'ADN-T de la bactérie vers la cellule végétale soit au cours de l'insertion de l'ADN-T dans le génome végétal donnant ainsi des ADN-T incomplets. Par ailleurs, les plantes 1 et 2 ont plus de copies du gène *nptII* que d'insert *uidA* (Tableau 24). D'après les analyses moléculaires, la plante 1 possède quatre ADN-T dont un semble avoir perdu le gène *uidA*. Ainsi, une des quatre copies de l'ADN-T est incomplète. De plus, les inserts à 11,5 et à 3 kb (Planche 17) sont communs entre les deux hybridations. La copie de l'ADN-T située à 3 kb est flanquée par deux sites *Hind* III situés chacun à proximité de la frontière droite et de la frontière gauche. La copie de l'ADN-T d'une taille de 11,5 Kb peut être soit délimitée par un site *Hind* III situé à une distance d'environ de 8 Kb de chacune des deux frontières soit elle peut avoir son site *Hind* III perdu et l'hybridation avec les deux sondes utilisées donne toujours une copie d'ADN-T ayant la même taille. De la même manière, la plante 2 contient cinq ADN-T dont deux semblent être incomplètes. Ici encore on note un réarrangement dans l'ADN-T du fait de la perte du site *Hind* III pour la copie de 11,5 Kb ou

son encadrement à une distance de 8 Kb par deux sites *Hind* III. Afin de confirmer ceci un séquençage de l'ADN-T au niveau du site *Hind* III et de l'ADN génomique flanquant l'ADN-T serait nécessaire.

L'analyse par hybridation confirme que les plantes 5 et 6 présentent les même types d'insertion des gènes *nptII* et *uidA* et qu'ils proviennent du même événement de transformation. Les plantes 1, 2, 3, 4, (5 et 6) et 7, transformées par la souche pTDE4, sont des plantes issues d'événements de transformation indépendants. Une partie des séquences de l'ADN-T insérées ont un des gènes délété (exemple plantes 1, 2 et 5 ou (6)).

8-2 Caractérisation moléculaires des plantes transformées par la construction pGSGLUC1

8-2-1 Hybridation avec la sonde *uidA*

L'ADN des plantes transformées (plantes 8 et 9) par pGSGLUC1 a été digéré par l'enzyme de restriction *Bcl* I qui coupe l'ADN-T en deux fragments : un fragment contenant une partie du gène *uidA* et l'autre fragment renfermant tout le gène *nptII* (Figure 13). L'ADN-T contient un seul site *Bcl* I l'autre site se trouve dans la séquence d'ADN de plante.

Cette digestion devra nous permettre de révéler un ou plusieurs fragments du gène intégré.

Le profil d'hybridation (planche 18A) montre q'une seule bande du gène *uidA* a été incorporée. Cette copie a une taille variable suivant la plante transformée.

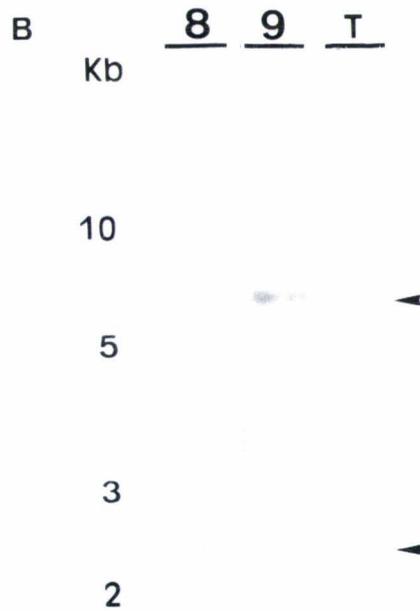
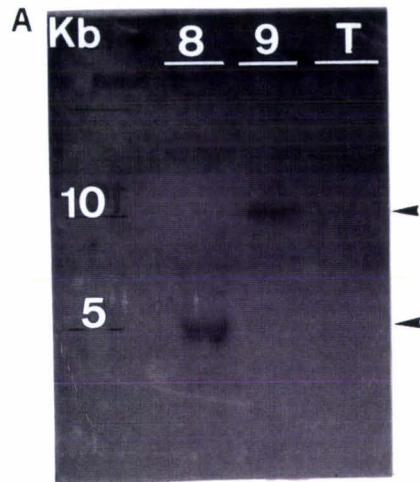
8-2-2 Hybridation avec la sonde *nptII*

L'hybridation avec la sonde *nptII* montre la présence d'une seule copie du gène *nptII*. Sa taille est différente pour les deux plantes (8 et 9) analysées (planche 18B).

8-2-3 Conclusion

L'analyse moléculaire des plantes transformées par pGSGLUC1 montre, pour les deux plantes testées, une copie de chaque gène de l'ADN-T. Leur ADN-T semble être complet.

PLANCHE 18



Analyse par Southern des plantes de chicorée transformées par la souche
pGSSLUC1.

A : Hybridation avec la sonde *uidA*.

B : Hybridation avec la sonde *nptII*.

T : témoin non transformé.

8 et 9 : plantes transformées.

9. Analyse de la génération F1

Les graines issues par autofécondation des plantes 1, 2, 3, 4, 7, transformées par la souche pTDE4 et des plantes 8 et 9 transformées par la souche pGSGLOC1, ont été analysées pour étudier la transmission du gène de sélection. La détermination de la ségrégation a été faite à l'aide du test X^2 .

Les graines sont désinfectées et mises à germer sur le milieu H20. Les germinations sont sélectionnées sur ce milieu contenant $75 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de kanamycine. Nous avons observé un taux de germination faible dans la génération F1 comparée au témoin non transformé (T⁻, Tableau 25).

Plantes testées	Graines mises à germer	Graines germées	% de germination
T ⁻	98	73	75
1	173	62	36
2	215	72	33,5
3	44	16	36,5
4	133	91	68,5
7	51	17	33,5
8	59	29	49
9	150	59	39,5

Tableau 25 : Pourcentage de germination des plantes transformées et du témoin non transformé (T⁻)

Les plantules résistantes à la kanamycine sont bien chlorophylliennes et forment des racines sur le milieu de sélection. Les plantes transformées par la souche pTDE4 développent très difficilement des racines, de plus ces dernières sont peu nombreuses et très peu ramifiées. Ceci permet de comprendre la difficulté à l'enracinement rencontrée chez les transformants primaires. Cette difficulté d'enracinement pourrait être due à un faible taux d'expression du gène *npII* sous le promoteur *nos* ce qui entraîne une faible phosphorylation de la kanamycine. Il aurait fallu utiliser une faible concentration de la kanamycine dans le milieu de sélection pour faciliter le développement des racines.

L'obtention de très peu de graines chez certaines plantes et les importantes contaminations fongiques et bactériennes ont rendu difficile l'analyse de la résistance *in vitro* à la kanamycine (Tableau 26). Lorsqu'un caractère dominant est transmis, il ségrège dans la plupart des cas, dans les proportions 3 : 1, proportions attendues pour la présence d'un seul locus d'insertion. D'après ces premières analyses on peut dire que la résistance est monogénique et que le caractère de résistance à la kanamycine est transmis comme un caractère dominant pour les plantes 4, 7, 8 et 9 (tableau 18). La ségrégation du caractère de résistance à la kanamycine suit les proportions mendélienne chez ces plantes. Par contre, chez les plantes 1, 2 et 3 la résistance la transmission du caractère étudié n'est pas mendélienne. En effet, ces plantes ont un taux de ségrégation inversé 1 : 3 (Tableau 26) indiquant que la résistance à la kanamycine peut être récessive chez ces dernières. Néanmoins, tous les transformants primaires issus d'explants foliaires ou cotylédonaire transmettent cette résistance. Cependant, le caractère de résistance ne suit pas toujours une répartition mendélienne.

Plantes testées	Nombre de graines testées	plantules résistantes	Plantules sensibles	Test- X^2
1	62	23	39	47, 5
2	72	18	54	96
3	16	4	12	21, 3*
4	91	69	22	0, 033
7	17	13	4	0, 019*
8	29	19	10	1, 39
9	59	40	19	1, 63

Tableau 26 : Ségrégation du caractère résistance à la kanamycine des plantes transgéniques de chicorée.

La valeur du test $X^2 \geq 3, 83$ implique une déviation significative du taux de ségrégation attendu pour 3 : 1 à $P = 0,05$.

* : Valeurs non significatives, obtenues sur des effectifs de moins de vingt plantules .

Nous avons pensé à utiliser le test G qui confirme l'homogénéité dans les tests statistiques. Ce test permet une bonne description de la distribution des fréquences. De plus il est également utilisé pour des ségrégation qui ne suivent pas les lois génétiques attendues par les fréquences mendéliennes. C'est un test additif, il permet de confirmer une hypothèse sur plusieurs classes en même temps. Le test G (tableau 27) a été utilisé d'une part pour les plantes

1 et 2 qui ne présentent pas une ségrégation mendélienne attendue d'un caractère dominant et d'autre part pour les plantes 4, 8 et 9 qui transmettent le caractère de résistance dans les proportions 3 : 1. Ce test est appliqué sur cette descendance pour vérifier la conformité des résultats obtenus par le test X^2 .

Nous avons supprimé les données des plantes 3 et 7 parce que le nombre des plantes sensibles est faible (inférieur à 5) et le test G n'est applicable que pour des valeurs supérieures à cinq.

Les résultats sont présentés sur le tableau suivant.

Plantes testées	Plantules résistantes	Plantules sensibles	X^2 (R/S) 3 : 1	X^2 (S/R) 1 : 3	Test-G
1	23	39	-	3.63	}2.29
2	18	54	-	0.00	
4	69	22	0.03	-	}1.74
8	19	10	1.39	-	
9	40	19	1.63	-	

Tableau 27 : Taux de ségrégation de quelques transformants résistants à la kanamycine
Le test G est utilisé à une probabilité $P = 0,001$

Le test G confirme le résultat obtenu par le test X^2 à savoir :

- la répartition mendélienne d'un caractère dominant pour les plantes 4, 8 et 9,
- la transmission d'un caractère récessif chez les plantes 1 et 2.

L'hétérogénéité dans la transmission du gène de la résistance à la kanamycine sur l'ensemble de la descendance est due à un problème de ségrégation.

III. Transformation par électroporation

1. Isolement des protoplastes et électroporation

1-1 Isolement des protoplastes

Les protoplastes sont isolés à partir de jeunes feuilles de chicorée (planche 19A). Les enzymes caylase-345 et caylase-M2 utilisées en association sont dissoutes dans le milieu PO qui constitue le milieu de macération. Nous avons utilisé la caylase-345 aux concentrations de 3 et 1 mg.ml⁻¹. La durée de macération en présence de 3 mg.ml⁻¹ de caylase-345 est de 5 h 30 et de 16 h pour une concentration de 1 mg.ml⁻¹.

Nous n'avons pas fait varier la concentration de la caylase-M2 car il semble qu'elle contient des protéases qui détériorent les cellules quand sa concentration dépasse 0,5 mg.ml⁻¹. Sa concentration est donc maintenue à 0,5 mg.ml⁻¹. L'incubation est réalisée à l'étuve à 30°C à l'obscurité pendant 16 h.

Les résultats rapportés dans le tableau 28 montrent que le nombre de protoplastes libérés est important après 16h de macération (95%). Ce nombre diminue rapidement au bout de 24h, vingt pourcent de protoplastes sont éclatés et on observe à la fois des protoplastes nécrosés et de nombreux chloroplastes provenant de la lésion des protoplastes en suspension dans le milieu. Après 5h 30 de macération, le nombre de protoplastes est de 80% et il est réduit à 50% 24 h après l'isolement.

Durée de macération à 30°C	Concentrations d'enzymes	Taux de survie après isolement des protoplastes (%)	Taux de survie 24h après l'isolement (%)
5 h30	- 3 mg.ml ⁻¹ 345	81	50
16 h	- 1 mg.ml ⁻¹ 345	95	75

Tableau 28 : Effet de la concentration de la caylase-345 et de la durée de macération sur la production des protoplastes vivants.

Pour la suite du travail nous avons utilisé la solution enzymatique contenant 3 mg l⁻¹ de caylase-345 et 0,5 mg l⁻¹ de caylase-M2.

1-2 Electroporation

Afin de déterminer la valeur de la différence de potentiel (d.d.p.) pour laquelle un taux élevé de survie est obtenu, les protoplastes isolés sont soumis à une série de décharges électriques allant de 200 à 600 V/cm à une capacité de 960 µF. Les résultats (tableau 29) montrent que le taux de survie est fonction de l'intensité de la décharge électrique. A partir de 400 V, le nombre de protoplastes viables est réduit d'un facteur de 2,5 par rapport au témoin n'ayant pas subi de traitement électrique.

	Témoin	200 V	300 V	400 V	500 V	600 V
% de survie des protoplastes	75	54	43	29	16	11

Tableau 29 : Pourcentage de survie des protoplastes après traitement électrique et après 24h de culture.

Le témoin n'est pas soumis à l'électroporation.

Les protoplastes de la chicorée sont donc très sensibles aux chocs électriques. L'électroporation à 200 V permet d'obtenir le meilleur taux de survie. Cette valeur serait intéressante pour la suite du travail ; cependant nous avons pensé qu'elle ne permettrait pas de former suffisamment de pores. Par conséquent nous avons choisi d'appliquer une d.d.p. de 300 V même si le pourcentage de survie est diminué d'environ 10% (tableau 29).

Afin de déterminer si les protoplastes sont perméables après le choc électrique, un aliquot de suspension de protoplastes est resuspendue dans une solution de calcéine à une concentration finale de 2,5 mM. La calcéine permet d'étudier la perméabilité des protoplastes après le choc électrique. La perméabilité des protoplastes a été observée au microscope à fluorescence après 24h de culture à 30°C. Les protoplastes fluorescents apparaissent bien

circulaires et ne montrent aucun changement morphologique dû à l'électroporation (planche 19B).

Afin de déterminer la concentration optimale de transfert d'ADN dans les protoplastes de chicorée, nous avons fait varier la concentration d'ADN plasmidique. Ainsi, pour une densité de 10^6 protoplastes.ml⁻¹, nous avons utilisé des concentrations d'ADN plasmidique de 0, 25, 50 ou 75 µg. Par ailleurs, des électroporations ont été effectuées en présence ou en absence de 50 µg d'ADN entraîneur. L'ADN entraîneur protège l'ADN plasmidique contre les attaques des désoxyribonucléases non spécifiques.

Le test GUS est effectué selon Jefferson *et al.* (1987). Il est utilisé 24 h après l'électroporation. L'efficacité de la transformation est exprimée en fonction du nombre de cellules exprimant le gène *uidA*. Le nombre de cellules bleues dans chaque boîte de Pétri (planche 19 C et D) contenant 10^5 protoplaste/boîte est compté 24 h après le test GUS.

Concentration de l'ADN plasmidique en µg	0	25	50	75
Fréquence de transformation .10 ⁻⁵ avec ADN entraîneur	0	3	9	15
Fréquence de transformation .10 ⁻⁵ sans ADN entraîneur	0	0	0	1

Tableau 30 : Fréquence de transformation des protoplastes en fonction de la concentration de l'ADN plasmidique et de la présence ou l'absence de l'ADN entraîneur.

L'ADN entraîneur est utilisé à 50 µg.

La fréquence de la transformation est le rapport du nombre de protoplastes exprimant le gène *uidA* sur le nombre total de protoplastes observés.

Les résultats (tableau 30) montrent que le nombre de cellules exprimant le gène *uidA* est corrélé à la quantité d'ADN plasmidique utilisée. En effet, la fréquence de transformation la plus élevée ($1,5 \cdot 10^{-4}$) est obtenue pour une concentration d'ADN plasmidique de 75 µg. L'expression du gène *uidA* est détectée 48h après l'électroporation. Cette expression se

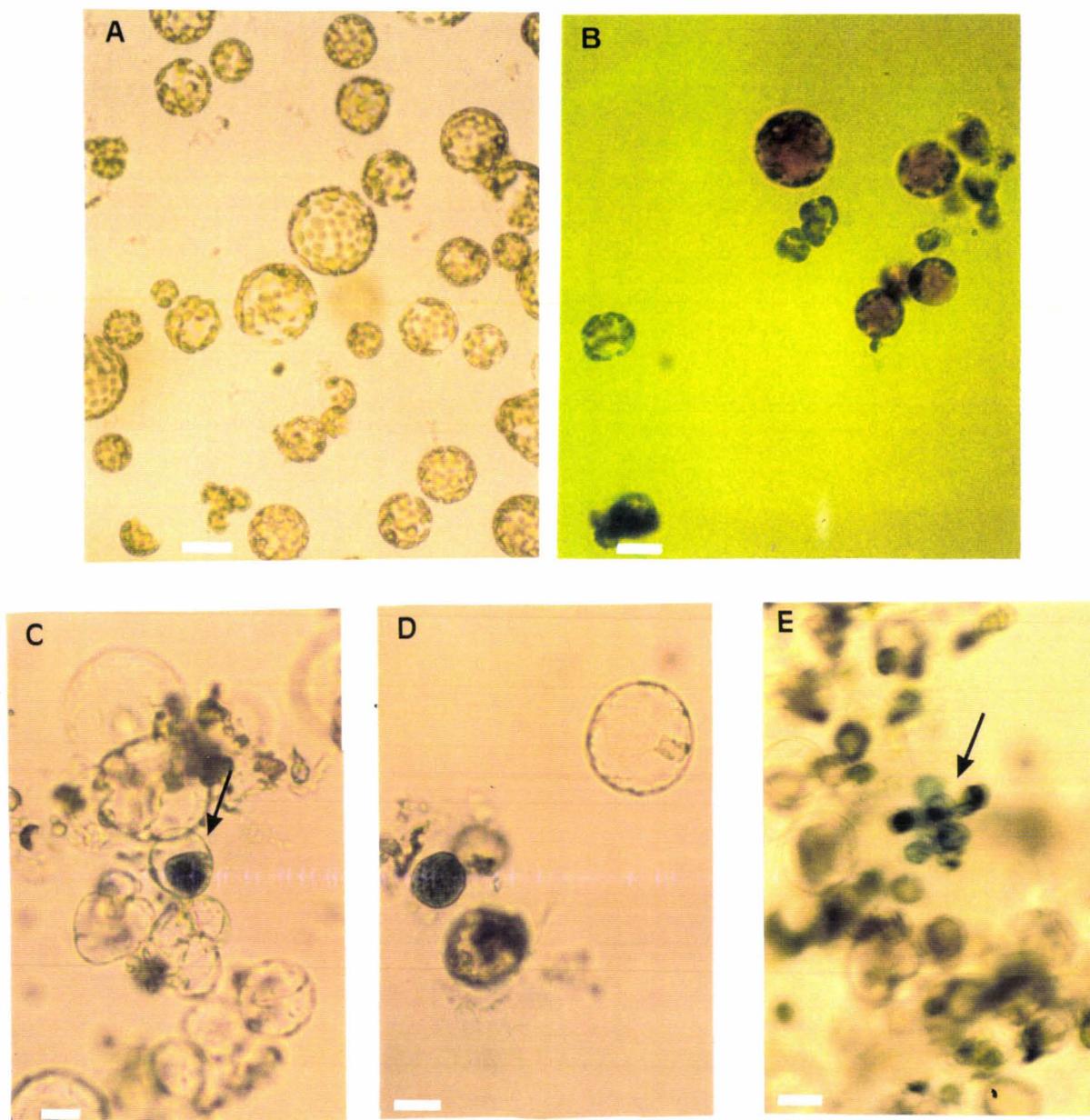
maintient dans les cellules en division en formant un microcol (planche 19E). Ceci prouve d'une part, l'intégration et l'expression du gène *uidA* dans les protoplastes et d'autre part la possibilité de régénérer des cellules qui peuvent être transformées de façon stable.

La présence de l'ADN entraîneur est nécessaire pour l'expression du gène *uidA* dans les protoplastes. En effet, la fréquence de transformation est nulle en l'absence de l'ADN entraîneur. Il semblerait que l'ADN entraîneur augmente l'expression transitoire en protégeant l'ADN plasmidique contre les attaques des désoxyribonucléases non spécifiques.

Les cellules soumises au test GUS ont une taille réduite et une morphologie altérée. Cette déformation des protoplastes peut être due à un effet négatif du substrat X-GLUC sur les cellules. Ceci rend difficile le dénombrement des cellules transformées. Toutefois, la fréquence de transformation reste faible comparée à celle trouvée par Dhir *et al.* (1991) chez *Glycine max* où elle est de $6,8 \cdot 10^{-4}$, le tabac (Negrutiu *et al.*, 1987) et *Oryza sativa* (Yang *et al.*, 1988) où la fréquence de transformation est de 10^{-2} .

Les résultats d'électroporation montrent que cette technique est prometteuse chez la chicorée, mais qu'elle nécessite d'être optimisée.

Planche 19



Activité GUS dans des protoplastes transfectés de chicorée

(A) : Protoplastes isolés de jeunes feuilles de chicorée.

(B) : Aspect des protoplastes après électroporation. Les protoplastes sont resuspendus dans 2,5 mM de calcéine et sont observés sous microscope à fluorescence. Les protoplastes viables apparaissent rouges.

(C) et (D) : Activité GUS sur des protoplastes transfectés (flèches).

(E) : Activité GUS maintenue sur un microcalyx issu de la division d'un protoplaste transformé.

Barre = 20 μ m

DISCUSSION

I. Régénération et enracinement des bourgeons de la chicorée.

L'objectif du travail qui nous a été confié, fut l'étude des diverses conditions de la transformation de tissus et de protoplastes de chicorée par *Agrobacterium tumefaciens* et par électroporation.

La mise en oeuvre des techniques de transformation a nécessité de vérifier les aptitudes de régénération de la chicorée en culture *in vitro*. En ce qui concerne les tissus de chicorée, et en nous inspirant des travaux réalisés par Sene (1984) et par Dubois *et al.* (1988) sur la chicorée, il nous a été possible de définir pour les racines tubérisées des conditions de milieux favorables à la régénération de bourgeons. Des bourgeons de qualité satisfaisante (couleur, vigueur et vitrosité) sont issus de fragments de racines tubérisées après 15 jours de culture sur un milieu de Heller à 5 g.l⁻¹ de saccharose. L'avantage que présentent les explants issus de racines tubérisées réside dans le fait qu'ils prolifèrent très rapidement et qu'ils sont susceptibles de produire des pousses feuillées sur un milieu extrêmement simple. Il nous a semblé intéressant de les utiliser pour la transformation de la chicorée. Cependant l'utilisation des racines tubérisées présente plusieurs inconvénients. D'abord, elles ne sont disponibles que pendant une période limitée de l'année, de novembre à mars. Ensuite les racines généralement arrachées en automne sont entreposées en chambre froide ; pendant cette période de stockage, les propriétés physiologiques et les aptitudes à la régénération sont modifiées. Il était donc souhaitable de disposer d'un matériel ne présentant pas ces inconvénients.

Nous avons donc envisagé d'utiliser les tissus foliaires et les tissus cotylédonaire étiolés prélevés sur des plantules issues de la germination de graines de chicorée. Contrairement aux racines, les feuilles et les cotylédons exigent la présence de cytokinines pour régénérer des bourgeons. L'utilisation d'un milieu de Murashige et Skoog avec de la BAP à 0,1 mg.l⁻¹, nous a permis d'obtenir en trois semaines des bourgeons viables et vigoureux capables de s'enraciner et de donner naissance à de nouvelles plantes fertiles.

Nous avons également étudié les conditions permettant d'améliorer l'enracinement des pousses feuillées. L'incorporation de proline ou l'enrichissement du milieu en nitrate entraînent une amélioration de l'enracinement des bourgeons par rapport au témoin. Le meilleur pourcentage (76%) d'enracinement des vitroplants est obtenu par l'adjonction du NAM à 0,1 mg.l⁻¹ dans le milieu de culture. Dans cette condition, nous avons fréquemment observé l'apparition, à la base de la pousse, d'un petit cal. Ce cal ne gêne apparemment pas la connexion

entre la racine et la partie aérienne, puisque les plantes se développent normalement. En présence du NAM, les plantes différencient de nombreuses racines. Le NAM est métabolisé par la chicorée à l'aide d'hydrolases aspécifiques (Vuylsteker *et al.*, 1992). Les plantules sont capables de transformer le NAM en acide naphtylacétique (ANA) qui est une auxine. L'ANA est connu pour son action rhizogène. Elle stimule la néoformation de racines à la base des bourgeons.

Il était donc possible sur des milieux différents, d'induire la callogenèse et de régénérer des bourgeons à partir de fragments de racines tubérisées, de feuilles et de cotylédons étiolés de la chicorée. Leur enracinement étant amélioré en présence du NAM, on pouvait par conséquent, envisager de transformer la chicorée par *Agrobacterium tumefaciens*.

II. Transformation des différents organes de la chicorée

La première étape expérimentale fut de déterminer la dose d'antibiotique à employer dans les milieux de culture pour empêcher la croissance des cellules. Il est apparu qu'il existait une différence de sensibilité pour cet antibiotique entre les tissus de la chicorée. En effet, les feuilles et les cotylédons sont plus sensibles à la kanamycine que les fragments de racines tubérisées. Les réserves importantes contenues dans les explants racinaires peuvent expliquer la sensibilité moindre de ces tissus à la kanamycine. Mais dans tous les cas, la régénération des différents organes de la chicorée est inhibée en présence de $75 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de kanamycine.

Nous avons utilisé trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* : la souche pTDE4, la souche pGSGLOC1 et la souche pVD1124. Leurs ADN-T contiennent les mêmes gènes : *nptII* et *uidA*, mais sont régulés par des promoteurs différents : les gènes de la souche pGSGLOC1 sont contrôlés par un promoteur double TR 1'-2' de la mannopine synthase ; ceux des souches pTDE4 et pVD1124 sont contrôlés par deux promoteurs différents. Le promoteur 35 S du virus de la Mosaïque du Chou-fleur (CaMV) contrôle le gène *uidA* et le promoteur *nos* de la nopaline synthase précède le gène *nptII*. Le gène *uidA* de la souche pVD1124 contient un intron ce qui permet de déterminer si l'événement de transformation (c. a. d. intégration de l'ADN-T dans le génome végétal) a eu lieu.

1. Transformation des explants racinaires

Notre étude a débuté par la transformation des explants racinaires de la chicorée avec les souches pGSGLUC1 et pTDE4. Les explants racinaires ont été mis en contact avec la suspension bactérienne pendant 20 min et la coculture a duré 48h sur milieu solide. La fréquence de transformation obtenue par de tels essais a été faible, n'atteignant que 5%. Des durées de coculture de plus de 48 h ou d'une coculture de 24 h en milieu liquide agité ainsi qu'un "tartinage" des explants n'ont pas abouti à une amélioration du rendement de la transformation. Pour essayer d'améliorer la fréquence de transformation des explants racinaires de la chicorée, nous avons également testé une gamme de concentration d'acétosyringone. Le traitement par ce composé phénolique n'a pas augmenté le pourcentage de transformation des explants racinaires. Peut être la blessure de la racine induit elle une production importante de polyphénols qui satureraient les sites récepteurs bactériens. L'addition d'acetosyringone serait alors inefficace. On pourrait également supposer que la blessure des racines de chicorée provoque la production de composés phénoliques toxiques pour la bactéries. La difficulté d'obtenir des plantes transgéniques aurait pu être liée à la production de latex lors du découpage des explants racinaires empêchant l'attachement bactérien aux explants. D'une façon surprenante l'analyse en microscopie électronique à balayage d'explants racinaires mis en coculture 48h en milieu solide a révélé une forte présence de bactéries sur les parties blessées des explants. De même, l'analyse en microscopie électronique à transmission montre que les bactéries se trouvent entre les méats intercellulaires. Ceci prouve que le pouvoir infectieux d'*Agrobacterium tumefaciens* n'est pas inhibé par la production du latex ni par la production de phénols toxiques.

Malgré la forte densité des bactéries sur les explants racinaires, la transformation n'a pas abouti efficacement à obtenir des bourgeons stablement transformés. Par ailleurs, quelques explants qui ont subi l'étape de préculture et 48 h de coculture ont été analysés en microscopie à balayage et en transmission. Ces explants ne montrent pas de différence en ce qui concerne l'attachement bactérien comparé à la phase sans préculture. Ceci va dans le sens de résultats obtenus lors d'essais préliminaires de préculture d'explants racinaires pendant 48 h. En effet, la préculture n'a eu aucun effet sur l'amélioration du taux de transformation des explants racinaires.

Les plantes transformées ont été testées pour l'activité β -glucuronidase. L'analyse de l'activité GUS a été effectuée à divers stades de développement des régénérants ; ils révèlent

une activité GUS variable. En effet, une première analyse effectuée sur les bourgeons au stade deux feuilles révèle une activité GUS très importante puis quand de nouvelles feuilles de rang 3 et 4 se forment, l'expression devient faible et finit par ne plus être détectable. Cette instabilité peut être due :

- 1- soit à la structure des explants racinaires,
- 2- soit à la régénération de bourgeons chimériques,
- 3- soit à une expression transitoire du gène introduit.

En ce qui concerne **la structure des explants racinaires**, les petits tronçons de 6 mm de diamètre et de 2 mm d'épaisseur sont prélevés au niveau de l'assise cambiale de la racine tubérisée de chicorée. La difficulté d'obtenir des plantes transgéniques à partir des explants de racines tubérisées pourrait être due à une faible compétence à la transformation des cellules méristématiques. Par ailleurs, il a été montré que les cellules méristématiques indifférenciées ont très peu ou pas de récepteurs pariétaux nécessaires à l'attachement d'*Agrobacterium* (Lippincott et Lippincott, 1978 ; Schläppi et Hohn, 1992). La résistance de ces cellules à *Agrobacterium tumefaciens* a été observée chez d'autres espèces de plantes. En effet, le dôme méristématique des embryons zygotiques d'*Arabidopsis thaliana* (Sangwan *et al.*, 1991) résiste à la transformation par *Agrobacterium* ; il en est de même pour les apex caulinaires de *Lens culinaris* Medik (Warkentin et McHughen, 1992). Chez *Cicer arietinum* L. (Fontana *et al.*, 1993) l'obtention de plantes transgéniques n'est possible que lorsque le dôme méristématique est enlevé de l'embryon.

Il semble bien que la présence de cellules cambiales dans les explants racinaires de la chicorée ne permette pas une transformation génétique efficace *via Agrobacterium tumefaciens*.

Sur un milieu aussi simple que le milieu de Heller, les explants racinaires prolifèrent intensément et différencient rapidement des bourgeons vigoureux. **La formation de bourgeons chimériques** possédant des cellules stablement ou transitoirement transformées et des cellules non transformées pourrait être assez fréquente. Par ailleurs, les bourgeons issus de racines tubérisées montrent une activité GUS instable dans le temps. Ceci suggère que les bourgeons issus de racines tubérisées se caractérisent par une forte fréquence d'échappement qui est observée quand ils se développent en présence de l'agent sélectif. Cet échappement est aidé par la présence des cellules transgéniques qui phosphorylent l'antibiotique favorisant le développement des cellules non transformées.

L'expression peut être aussi transitoire si les copies de l'ADN-T ne sont pas intégrées dans le génome de la chicorée comme cela a été suggéré par Horsch et Klee (1986). L'expression transitoire est probablement due à une circularisation de l'ADN-T qui est éliminé ultérieurement au cours des divisions ; un tel cas a été observé dans des tissus de tabac (Van Lijsbettens *et al.*, 1986).

Du fait de l'apparente incompétence à la transformation des cellules cambiales présentes dans les explants racinaires de la chicorée et de la difficulté à obtenir des plantes qui demeurent transformées de façon durable, nous avons été amené à abandonner l'utilisation d'explants de racines tubérisées pour réaliser la transformation génétique de la chicorée par *Agrobacterium tumefaciens*.

2. Transformation des explants foliaires et cotylédonaire

En ce qui concerne les cotylédons, une meilleure fréquence de transformation a été obtenue sans phase de préculture et ceci pour les deux constructions (pGSGLOC1 et pTDE4). De plus, l'utilisation de la construction pVD1124 d'*Agrobacterium tumefaciens* confirme l'efficacité de transformation chez ces explants. En effet, la détermination précoce de la transformation à l'aide du gène *uidA* contenant un intron a montré que les explants cotylédonaire présentent plus de cellules infectées au niveau des blessures que les explants foliaires. Cette fréquence de transformation est facilitée par l'addition de l'acétosyringone à 100 µM dans le milieu de coculture. Des essais préliminaires de transformation sans acétosyringone n'ont pas abouti. Il est fort probable que les explants foliaires et cotylédonaire de la chicorée n'excrètent pas suffisamment de composés phénoliques qui induisent les gènes de virulence (Stachel *et al.*, 1985).

Dans le but d'augmenter l'efficacité de transformation, nous avons aussi introduit une phase de préculture. Cette phase semble être une étape importante de la transformation des feuilles de la chicorée. La fréquence de transformation a été augmentée d'un facteur de 1,8 chez ces explants. Un tel résultat a également été trouvé chez le tabac (Chriqui *et al.*, 1988), *Arabidopsis thaliana*, (Schmidt et Willmitzer, 1989), la pomme de terre (Tavazza *et al.*, 1988) et le lin (McHughen *et al.*, 1989). Pour chaque type de tissu, une durée de préculture optimale est nécessaire pour que l'explant soit plus sensible à la transformation génétique par *Agrobacterium tumefaciens*. Dans nos expériences, l'augmentation de la fréquence de

transformation de la feuille a été obtenue après une préculture de 3 jours. Cette étape pourrait avoir plusieurs effets :

- elle semble jouer un rôle dans la réduction du stress provoqué par les blessures (van Wordragen et Dons, 1992) et pourrait entraîner l'accumulation de composés aromatiques activant les gènes de virulence d'*Agrobacterium* (Bolton *et al.*, 1986 ; Fillatti *et al.*, 1987 ; Zambryski *et al.*, 1988).

- l'activation des divisions cellulaires par les régulateurs de croissances (auxine et cytokinine) (Neskovic *et al.*, 1985) entraîne un changement structural des parois cellulaires favorisant le transfert de l'ADN-T (Lowe et Krul, 1989 ; Sangwan *et al.*, 1990, 1992). Les cellules en division paraissent plus accessibles à *Agrobacterium tumefaciens* que celles qui ne se divisent pas (An, 1985 ; Janssen et Gardner, 1989). En fait, la présence d'une paroi nouvellement formée autour des cellules faciliterait l'attachement des agrobactéries (Krens *et al.*, 1985 ; Binns *et al.*, 1990, 1991 ; Sangwan *et al.*, 1992).

- la préculture a un rôle dans la dédifférenciation des tissus qui serait favorable à la transformation génétique de l'explant. Il est fort probable que l'état de division des cellules facilite l'intégration de l'ADN-T dans le génome (Mayerhofer *et al.*, 1990 ; Gheysen *et al.*, 1991). En fait, la division cellulaire semble nécessaire à une transformation efficace des cellules de l'explant. Cette activité cellulaire favoriserait l'intégration stable de l'ADN-T dans le génome de la cellule. Des travaux récents ont montré que des mutants d'*Arabidopsis* obtenus par des traitements aux rayonnements ultraviolets présentent une réduction de la fréquence de transformation de 5 à 80% par rapport aux plantes de type sauvage (Sonti *et al.*, 1994). De plus, ces plantes ont une déficience dans l'insertion de l'ADN-T dans leur génome. Koncz *et al.* (1989 ; Herman *et al.* (1990) montrent que l'ADN-T s'intègre préférentiellement dans des régions transcriptionnellement actives . Ainsi la blessure des cellules et la préculture des explants de plante stimulent la prolifération des cellules, la synthèse de l'ADN de la plante et active le système de réparation, utile à la recombinaison de l'ADN-T.

Les observations en microscopie électronique par balayage et par transmission permettent d'établir une corrélation entre la présence des agrobactéries à la surface des explants et les fréquences de transformation obtenues chez les explants foliaires. Sur les explants cotylédonaire, une forte densité bactérienne s'observe quand il n'y a pas eu d'étape de préculture et la fréquence de transformation (15%) n'est élevée que lorsque l'étape de

préculture est ôtée. Cependant, à l'aide de la microscopie électronique à transmission, des bactéries ont été observées entre les cellules quand l'étape de préculture a été appliquée. L'étape de préculture semble être importante à l'accessibilité des bactéries aux cellules. Mais elle semble avoir un effet négatif sur la différenciation des bourgeons transformés. En effet, seulement 11% d'explants cotylédonaire transformés régénèrent des bourgeons après la phase de préculture.

Sur les explants foliaires, les bactéries sont surtout présentes après une phase de préculture et le taux de transformation est alors nettement augmenté (de 10% sans phase de préculture à 16% avec une phase de préculture). La préculture activerait le métabolisme cellulaire ce qui entraîne la synthèse de molécules qui stimulent les gènes de virulence (Bolton et al., 1986). L'effet de la préculture s'ajoute à celui de l'acétylsyringone rajouté au moment de l'infection. L'activité cellulaire favoriserait l'accessibilité d'*Agrobacterium* aux cellules (Chriqui et al., 1988).

L'adhésion des bactéries observées en microscopie à balayage montre qu'elles sont surtout localisées au niveau des blessures. Ce résultat va dans le sens de l'attraction bactérienne par des stimuli produits lors de la blessure. L'étape d'adhésion est nécessaire à l'infection des plantes par *Agrobacterium tumefaciens*. Dans ce cas, un récepteur bactérien spécifique, vraisemblablement de nature lipopolysaccharidique (Whatley et al., 1976) interviendrait dans l'adhésion initiale (Matthysse et al., 1981). Puis des sécrétions végétales stimulent la synthèse de microfibrilles de cellulose d'origine bactérienne. Celles-ci permettent de piéger un plus grand nombre de bactéries à la surface végétale et de les attacher irréversiblement, favorisant ainsi le processus d'infection. La production de fibrilles de cellulose a été rapportée chez *Agrobacterium*. Elles se forment une fois que les bactéries sont attachées et consolident leur accrochage. Une fibrille est formée par l'association des brins disposés dans le sens de la longueur. Chaque brin est composé d'une chaîne de résidus de glucose liés en $\beta(1-4)$. Tous les groupements hydroxyles participent à des liaisons hydrogènes inter et intrachânes. Une fibrille mesure de 1 à 25 nm de large sur 1 à 9 μm de long (association de 10 à 250 chaînes de 2.10^3 à 18.10^3 résidus de glucose (Ross et al., 1991). Ces différents composés pourraient agir comme molécules réceptrices ou molécules spécifiquement reconnues par un récepteur porté à la surface de la cellule. La participation de ces microfibrilles dans l'adhésion a été démontrée dans plusieurs cas. Toutefois, il faut signaler que la synthèse de ces microfibrilles n'est pas strictement indispensable à l'adhésion et à l'infection (Matthysse et al., 1983) ; elles confèrent cependant aux bactéries qui les synthétisent une infectivité accrue. Chez la chicorée, les microfibrilles de celluloses élaborées par les bactéries n'ont pas pu être détectées lors de nos

expériences. Il aurait peut être fallu faire beaucoup plus d'essais pour pouvoir les mettre en évidence. Cependant, nous notons une infectivité d'*Agrobacterium* chez la chicorée, puisque les bactéries pénètrent et se trouvent dans les méats intercellulaires dans les cotylédons. Selon Matthyse *et al.* (1981), les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* ne produisent des microfibrilles de cellulose en quantité importante que lorsqu'elles se trouvent en présence de la plante hôte. Chez la chicorée, l'absence de microfibrilles de cellulose pourrait être expliqué par le fait qu'*Agrobacterium* n'est pas un hôte préférentiel de la chicorée qui est beaucoup plus sensible à des espèces bactériennes du type *Erwinia*. Ceci peut être corrélé à la faible fréquence de transformation observée chez la chicorée, comparée à celle d'*Arabidopsis thaliana*, hôte incontestable d'*Agrobacterium* où la fréquence de transformation est supérieure à 75% quel que soit le tissu utilisé (Sangwan *et al.*, 1991; Sangwan *et al.*, 1992).

3. Protéines de la matrice extracellulaire

L'attachement des bactéries aux cellules de plantes peut se faire par des structures de l'enveloppe externe des bactéries à Gram⁻. Ces structures peuvent être des polysaccharides ou des protéines de la membrane externe. Ces différents composants pourraient participer à l'adhésion grâce à leur spécificité de structure. Ils pourraient agir comme récepteurs ou molécules spécifiquement reconnues par un récepteur porté à la surface d'un tissu végétal. Chez *Agrobacterium*, la participation d'une protéine membranaire, la rhicadhésine, à l'adhésion des bactéries sur les racines de pois a été démontrée (Smit *et al.*, 1992 ; Swart *et al.*, 1993). Des molécules végétales peuvent également être impliquées dans cet attachement. Parmi elles, on note des protéines de type vitronectine qui sont des glycoprotéines et qui ont été mises en évidence chez plusieurs espèces de plantes (Sanders *et al.*, 1991 ; Wagner et Matthyse, 1992 ; Zhu *et al.*, 1993). Ces protéines appartiennent à la matrice extracellulaire (MEC). Les protéines de type vitronectine se lient à la membrane plasmique par l'intermédiaire de récepteurs membranaires appelés intégrines (Hynes, 1987). Le tripeptide Arg-Gly-Asp (RGD), motif conservé dans la vitronectine, assure le couplage physique de la glycoprotéine avec les récepteurs de la membrane plasmique (Suzuki *et al.*, 1985 ; Vogel *et al.*, 1993) (Figure 14). Ce système permet des adhésions sélectives entre les cellules et le substrat (paroi végétale, *Agrobacterium*, ...). Chez la chicorée, l'utilisation d'un anticorps anti-vitronectine de souris, a permis de mettre en évidence des composants pariétaux qui croisent avec l'anticorps et qui pourrait être des molécules de types vitronectines. La réaction de reconnaissance est beaucoup plus importante dans des structures cellulaires qui peuvent être des dictyosomes d'ou dérivent

des réticulum endoplasmique. Récemment, Zhu *et al.*, (1994) ont isolé une protéine type vitronectine 1 (PVN1) à partir des cellules de tabac. D'une façon surprenante, la PVN1 est apparentée immunologiquement et structurellement au facteur d'élongation -1α (EF-1 α). Ce facteur forme un complexe avec le GTP et l'aminocyl t-ARN qui est transféré ensuite aux ribosomes situés sur le réticulum endoplasmique. Dans la mesure où les structures contenant du matériel reconnu par les anticorps anti-vitronectine constituent bien des éléments du réticulum, l'apparition d'une fluorescence dans les explants pourrait être attribuée à ce facteur d'élongation. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Zhu *et al.* (1994).

Le facteur EF-1 α est impliqué dans la régulation de la synthèse protéique (Yang *et al.*, 1993) et c'est également un facteur déterminant dans la transformation maligne des cellules animales (Tatsuka *et al.*, 1992). Il semble fort probable que les protéines de type vitronectine soient un membre de la famille des gènes qui codent pour le facteur EF-1 α . D'après Zhu *et al.* (1994), les protéines qui ont une structure similaire aux protéines EF-1 α agissent dans la MEC avec les récepteurs de la membrane plasmique pour assurer l'adhésion. Par ailleurs, Zhu *et al.* (1993) indiquent que les protéines de types vitronectine sont impliquées dans le système de détection du stress environnemental au niveau de la paroi, permettant ainsi une forte adhésion de la membrane plasmique à la paroi. De plus, les plantes contenant ce type de protéines présentent une grande infectivité vis à vis d'*Agrobacterium* (Wagner et Matthysse, 1992). Les motifs RGD des protéines pariétales est relié au cytosquelette par le complexe intégrine-actine. L'actine est une protéine qui assure la liaison entre la membrane plasmique et le cytosquelette. D'après Wagner et Matthysse, (1992), l'actine peut servir de voie de transport de l'ADN-T jusqu'aux noyaux des cellules.

La détection des protéines de type vitronectine chez la chicorée, suggère qu'elles peuvent être des récepteurs pour l'attachement d'*Agrobacterium* aux cellules de plantes. Contrairement à la vitronectine, les protéines de types fibronectine qui sont également des protéines de la MEC n'ont pas été détectées dans les tissus de la chicorée. Zhu *et al.* (1993) ont pu mettre en évidence ces protéines chez les cellules de tabac adaptées à un stress osmotique (en présence de 0,75 M NaCl) alors que les protéines de types vitronectine existent dans les cellules adaptées et non adaptées. L'adhésion par l'intermédiaire des protéines de type fibronectine dépendrait de l'environnement cellulaire et/ou d'éléments de la membrane plasmique enclenchant l'adhésion.

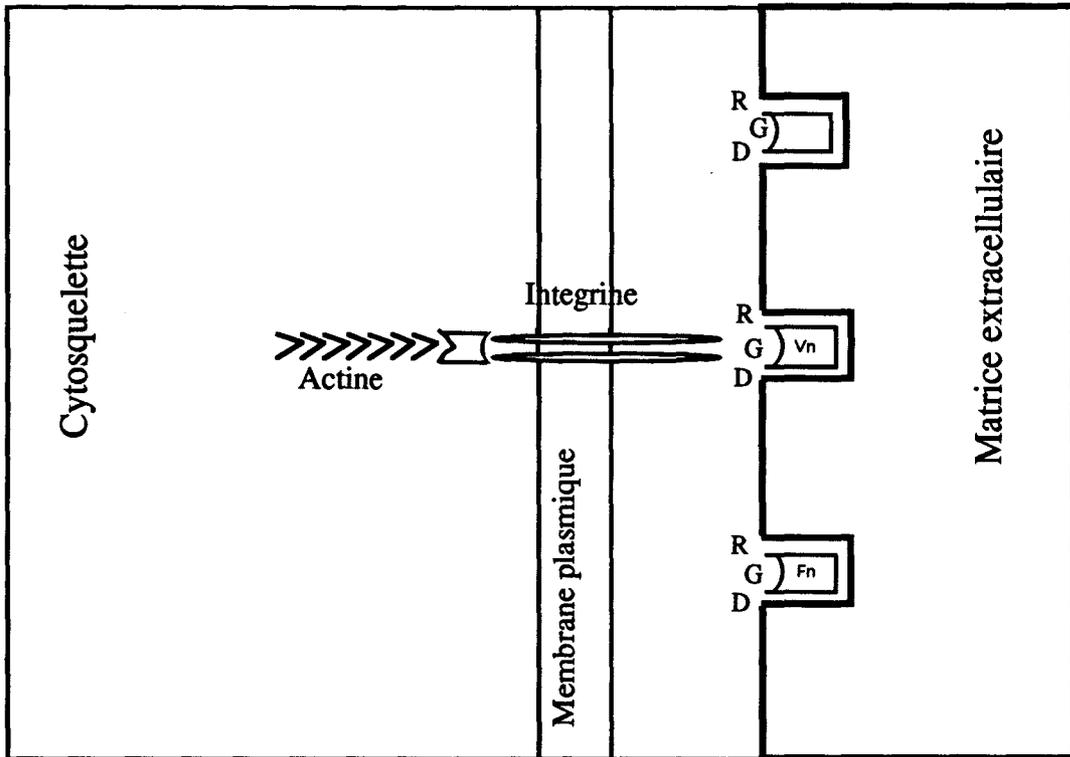


Figure 6 : Diagramme représentant l'adhésion entre la matrice extracellulaire et la membrane plasmique (d'après Wyatt et Carpita, 1993).

RGD : tripeptide Arg-Gly-Asp

Vn : vitronectine

Fn : fibronectine

4. Conclusion

Tout au long de l'expérimentation, nous avons tenté de mettre au point une méthode de transformation génétique de la chicorée par *Agrobacterium tumefaciens*. La technique réalisée est efficace et relativement simple par rapport à la méthode utilisée par Vermeulen *et al.* (1992) qui utilise des feuilles âgées de deux mois pour la transformation de la chicorée. Ainsi en présence de l'agent de sélection et dès le deuxième jour après inoculation, les tissus foliaires de

la chicorée sont totalement nécrosés. Nous n'avons jamais rencontré ce problème chez les explants foliaires âgés de trois semaines. De plus; Vermeulen n'a appliqué la concentration de sélection, qu'au moment de l'enracinement. Ceci présente deux inconvénients. D'une part, cette alternative contraint à repiquer un nombre important de bourgeons et d'autre part, elle peut favoriser l'obtention de plantes chimériques constituées de cellules transformées et de cellules non transformées. pour notre part, l'application précoce de la pression de sélection a limité l'obtention d'un grand nombre de bourgeons sensibles à la kanamycine. Par ce procédé et en présence de l'acétosyringone, nous avons obtenu à l'aide d'explants foliaires des bourgeons transformés. La fréquence de transformation a été améliorée par une étape de préculture. Après trois jours de préculture, les explants foliaires ne se nécrosent pas et des bourgeons se différencient au bout de trois semaines sur le milieu de sélection. Par ailleurs, nous avons utilisé des cotylédons étiolés. Le protocole de transformation est simple et rapide. Il nécessite en plus de la blessure, la présence de l'acétosyringone au moment de l'infection. Au bout de trois semaines, des bourgeons apparaissent sur les explants cotylédonaires. L'utilisation de la souche LBA4404 dans laquelle le gène de la β -glucuronidase contient un intron a montré que les explants cotylédonaires réagissent beaucoup plus à l'infection par *Agrobacterium*.

Nous avons également démontré la sensibilité de la chicorée à plusieurs souches d'*Agrobacterium tumefaciens*. Nous notons cependant que la fréquence de transformation est plus élevée pour les vecteurs pTDE4 et pVD1124 que pour le vecteur pGSGLOC1. Il est bien connu que des constructions plasmidiques différentes engendrent des fréquences de transformation différentes (An, 1985 ; Phillipone et Lurquin, 1989 ; Eimert et Siegemund 1992) ce qui confirme nos résultats.

Les bourgeons transformés issus d'explants foliaires et cotylédonaires révèlent une activité GUS stable dans le temps. Ces bourgeons sont transférés sur le milieu d'enracinement. Cependant, même si nous sommes parvenus à améliorer le taux d'enracinement des bourgeons régénérés, des difficultés d'enracinement des plantes transgéniques contenant le gène chimérique nos/*nptII* ont été observées. Un résultat semblable a été trouvé chez le pommier (James *et al.*, 1989), chez *Brassica juncea* (Mathews *et al.*, 1990), chez *Carthamus tinctorius* L. (Ying *et al.*, 1992) et chez *Cicer arietinum* L. (Fontana *et al.*, 1993). Cette incapacité d'enracinement est souvent due à un effet inhibiteur de la kanamycine même si les cellules synthétisent la néomycine phosphotransférase (Van Wordragen et Dons, 1992) ou à un faible taux d'expression du gène *nptII* placé sous le contrôle du promoteur nos.

III. Analyses des transformants

Plusieurs analyses permettent de vérifier que la transformation de la chicorée est bien établie :

- les tests colorimétriques et spectrofluorimétriques
- le test NPTII
- la caractérisation moléculaire des plantes résistantes
- la transmission du caractère de résistance à la kanamycine.

1. Analyse colorimétrique et spectrofluorimétrique chez les régénérants contenant TR2'-*uidA*

Le test histochimique effectué sur les plantes transformées par la construction pGSGLOC1 a montré que le gène *uidA* s'exprime différemment dans les tissus foliaires et dans les tissus racinaires. Dans les feuilles, le gène s'exprime dans tous les types cellulaires alors que dans les racines, l'activité β -glucuronidase est localisée dans les cellules externes du cortex racinaire et surtout dans les apex. Des résultats identiques ont été rapportés chez d'autres espèces par plusieurs auteurs (Langridge *et al.*, 1989 ; Saito *et al.*, 1990 ; Pawlicki *et al.*, 1992).

L'analyse fluorimétrique montre que **dans la racine** l'expression du gène *uidA* est induite par des blessures et par des régulateurs de croissance. La lacération des feuilles ou l'application pendant 24 h de 2,4-D, de l'AIA, de l'AG₃ et de l'ABA provoquent une augmentation plus ou moins importante de l'expression du gène *uidA* dans des fragments racinaires. Chez la chicorée, l'application de 2,4-D induit une réponse plus élevée du gène *uidA* que l'AIA. Des observations de Langridge chez le tabac avaient montré que les auxines augmentent effectivement l'expression des gènes placés derrière le promoteur TR. Cette régulation de l'expression implique la présence de séquences de régulation dans ce promoteur. L'utilisation des constructions chimériques comprenant le gène *uidA* placé sous le contrôle du promoteur TR dont certaines régions ont été déletées a montré que ce promoteur comporte des sous-domaines qui répondent à des signaux environnementaux et s'expriment à différents stades de développement (Ni *et al.*, 1994). Il est donc tout à fait probable qu'il comporte également des régions qui répondent à des signaux hormonaux, qui par des voies de transduction actuellement peu connues mettent en jeu un (des) facteur(s) de transcription.

L'ABA, hormone de stress, qui est synthétisée dans les apex racinaires, induit très fortement l'expression du gène *uidA* sous le contrôle de TR. Son action est 10 fois plus importante que celle du 2,4-D. Or des accumulations d'ABA ont été mises en évidence suite à des blessures (Zeevaart, 1988). Il est donc possible que l'induction du promoteur TR dépende non seulement d'une action auxinique mais résulte également d'une augmentation de la concentration intracellulaire d'ABA. Le fait que l'expression du gène *uidA* soit nettement plus importante après un traitement par l'ABA que par une blessure, pourrait être due à "un effet dose". Il serait intéressant de mesurer les modifications de la teneur en ABA de racines blessées. Le mécanisme moléculaire de l'action de l'ABA sur divers promoteurs n'est pas clairement compris. Comme le promoteur TR contient des régions induites par des blessures (Ni *et al.*, 1994), il est possible que l'action de l'ABA s'exerce sur ces mêmes séquences.

Quand à l'acide gibberellique (AG₃), on sait qu'il exerce très souvent une action antagoniste de celle de l'ABA. Ceci est particulièrement net dans la régulation de l'expression de gènes codant pour diverses hydrolases lors de la germination. Or dans les racines de chicorée, l'AG₃ agit dans le même sens que l'ABA puisque l'expression du gène *uidA* est également accrue ; cependant l'augmentation est nettement plus faible qu'après un traitement par l'ABA ; là encore il serait intéressant de voir si les séquences régulatrices sont identiques ou différentes de celles régulées par l'ABA.

D'une façon générale, les résultats des mesures fluorimétriques confortent les observations histochimiques que nous avons effectuées dans les racines de chicorée. En effet, l'apex de la racine est à la fois un lieu de synthèse de régulateurs de croissance tels que l'ABA ou les cytokinines mais aussi un lieu d'accumulation des auxines. De plus, Bourbouloux et Bonnemain (1974) ont montré que de l'auxine marquée déposée sur les feuilles de fève migre vers les racines et la répartition de la radioactivité est sensiblement identique à celle de l'activité β -glucuronidase dans les racines de chicorée. Dans la mesure où le promoteur TR contient des séquences impliquées dans la régulation par les phytohormones, l'observation d'une forte expression du gène *uidA* dans ces zones apicales ou dans les régions d'initiation des racines latérales est tout à fait cohérente. L'absence de l'expression dans la stèle signifierait alors ou bien que le transport des phytohormones par les tissus conducteurs, ou que leur concentration relative dans les sèves sont trop faibles pour induire de façon visible l'expression du gène *uidA*.

Dans les feuilles, l'expression est localisée dans tous les types cellulaires et principalement dans les tissus vasculaires. Le test fluorimétrique met en évidence une augmentation de l'expression du gène *uidA* par l'ABA, la blessure et surtout par le 2,4-D qui provoque une augmentation importante (12 fois). Ici encore, l'action du 2,4-D est plus importante que celle de l'AIA. Ce qui pourrait être la traduction d'un effet de dose, dans la mesure où la teneur en AIA actif serait faible ; on sait en effet que la molécule de 2,4-D est beaucoup plus stable que celle de l'AIA qui est photo- et thermolabile. On peut donc conclure que le promoteur TR est également induit par les composés auxiniques dans les feuilles de chicorée.

L'action de l'ABA est moins importante sur l'expression du GUS dans les feuilles que dans les racines. Son effet est 54 fois moindre dans les feuilles. Il augmente le taux d'expression du gène *uidA* seulement de 2,5 fois par rapport au témoin transformé non traité. Dans les feuilles, les cellules de garde sont des cibles sensibles à l'ABA qui peut s'y accumuler en quantité importante (Hartung et Baies, 1990). Cependant, l'analyse histochimique n'a permis de montrer une expression accrue de GUS. Par ailleurs, l'effet de blessures sur l'expression du gène *uidA* est nettement moins important (4 fois moindre) que dans les racines. D'autre part, l'expression induite par les blessures est faible et est localisée aux points de blessures, elle rappelle les réactions de production de phytoalexines lors d'une attaque par des agents pathogènes (Teeri *et al.*, 1989). Par contre, les cytokinines et l'AG₃ n'induisent que très faiblement l'expression du gène *uidA*.

Dans les organes reproducteurs l'expression est toujours la plus forte dans les tissus vasculaires. Dans ces conditions, on peut penser que les tissus vasculaires des organes floraux ont des teneurs élevées en auxine, ce qui permettrait l'induction de l'expression du gène *uidA* placé sous le contrôle du promoteur TR.

Dans les embryons matures, l'expression se trouve surtout dans les cotylédons ; lors de leur développement, l'expression s'estompe peu à peu et finit par ne plus être existante. Dans les jeunes feuilles de la plantule l'expression demeure localisée, mais devient générale dans les différents tissus des feuilles plus âgées.

L'expression du gène *uidA* placé derrière le promoteur TR2' semble donc subir une régulation spatio-temporelle, dont les mécanismes semblent très complexes. En effet, les différents sous-domaines du promoteur étant sensibles tant aux facteurs environnementaux

qu'hormonaux, il doit exister un réseau complexe de régulation, certains signaux pouvant emprunter des voies de transduction communes ou s'exprimer au niveau de séquences régulatrices communes. Malgré les travaux entrepris pour analyser ce promoteur TR, les mécanismes moléculaires qui permettent de comprendre sa régulation sont loin d'être élucidés.

2. Analyse colorimétrique et spectrofluorimétrique chez les régénérants contenant la souche contenant 35 S CaMV-*uidA*

L'analyse histochimique des plantes transgéniques transformées par la construction pTDE4 montre que le gène *uidA* placé derrière le promoteur 35S est actif dans les racines, dans les feuilles et dans la fleur.

Dans la racine, l'expression est variable selon les transformants. Chez certains l'expression est présente dans les tissus vasculaires de la racine. Des résultats similaires ont été observés chez d'autres espèces de plantes comme le soja, le tabac, le melon, la laitue et le colza (Williamson *et al.*, 1989 ; Dong et Mc Hughen, 1991 ; Lu *et al.*, 1991 ; Stefanov *et al.*, 1994 ; Cutris *et al.*, 1994). Dans d'autres transformants l'expression du gène *uidA* est absente de la stèle de la racine. Ces variations d'expression entre les transformants sont difficiles à expliquer. Longtemps, le promoteur 35S CaMV a été considéré comme induisant une expression constitutive "forte". Cependant, les travaux de Benfey *et al.*, (1990) ont montré qu'il était possible de distinguer plusieurs domaines gouvernant des expressions différentielles. Ces auteurs ont pu montrer que chez le tabac, le domaine B et plus précisément des régions désignées B4 et B5 gouvernent l'expression dans les tissus vasculaires. Il est donc probable que ces sous-domaines soient altérés chez ces transformants de chicorée qui ne montrent pas d'expression dans leur tissus vasculaires. Une autre explication est que la concentration des facteurs nucléaires qui agissent en *trans* pourrait être insuffisante pour induire une expression dans la stèle de la racine.

Dans les racines matures, l'expression est absente dans la région méristématique. Nagata *et al.* (1987) ont montré que le promoteur 35S est préférentiellement actif dans la phase S du cycle cellulaire. Il est probable que l'expression du gène *uidA* sous le contrôle du promoteur 35S nécessite des signaux spécifiques de la phase S du cycle cellulaire qui agissent sur les séquences de régulation induisant l'expression. La région du méristème apical des jeunes racines est caractérisée par des divisions intenses. La quantité de ces signaux est probablement très importante dans les méristèmes des jeunes racines et elle est réduite dans les

racines âgées. Ceci pourrait expliquer l'absence de l'expression dans les racines matures. Par ailleurs, le domaine A du promoteur 35S confère à lui seul, une expression dans la racine (Lam *et al.*, 1989). Ce domaine contient une séquence d'activation (as-1) qui, en présence du facteur nucléaire ASF-1, confère une expression dans l'apex de la racine, dans les zones d'émergence des racines latérales et dans les apex caulinaires (Benfey *et al.*, 1989 ; Fromm *et al.*, 1989). Il est donc probable que dans la racine mature où le taux de divisions est faible voire nul, la concentration du facteur ASF-1 est faible pour induire l'expression du gène *uidA*.

L'analyse de l'expression par fluorimétrie montre que le promoteur 35S est induit par le 2,4-D. En effet, l'activité GUS est augmentée d'un facteur de 1,5 par rapport au transformé non traité. Ce résultat rejoint des observations de Liu et Lam, (1994) chez le tabac transformé par une construction où le gène *uidA* est également dirigé par le 35S. Le domaine A responsable de l'expression dans les racines est induit par une auxine. Selon Liu et Lam (1994), l'auxine peut activer le facteur de transcription ASF-1. Cette forme activée de ASF-1 agit fortement sur la séquence as-1 ce qui active le promoteur 35S. L'action de l'auxine est donc indirecte, puisqu'elle agit sur le facteur ASF-1 préexistant. Par contre l'ABA et les blessures n'ont pas d'effet sur l'expression. Le promoteur 35S est régulé dans la racine par l'auxine et par le stade de développement.

Dans les feuilles, le promoteur est actif dans toutes les cellules. Cependant, l'expression n'est pas uniforme. Une hétérogénéité de l'expression du gène *uidA* a aussi été observée chez le riz et chez le maïs stablement transformés par le gène *uidA* (Klein *et al.*, 1989 ; Gordon-Kamm *et al.*, 1990 ; Hariss *et al.*, 1990 ; Meijer *et al.*, 1991). L'absence d'expression dans certaines cellules de la feuille pourrait être attribuée à un chimérisme (certaines cellules possèdent le gène *uidA*, d'autres non) ou à une expression différentielle du gène *uidA* due à l'activité métabolique dans les différentes cellules de la feuille (les cellules du tissu conducteur ont plus d'activité que les cellules du mésophylle).

Par ailleurs, l'analyse fluorimétrique montre une variation de l'expression entre les transformants. Les plantes testées (1, 2, 3, 4, 6 et 7) sont issues d'événements de transformation différents. Ainsi chaque plante est génétiquement unique. La variation de l'expression peut être attribuée à des effets de position ou au nombre de copies du gène contenues dans les transformants. Les plantes 3 et 6 possèdent deux copies du gène *uidA* et présentent une activité β -glucuronidase plus importante que les plantes 1 et 2 qui en renferment trois. De plus, les plantes 4 et 7 qui ont une seule copie du gène *uidA* présentent une activité β -

glucuronidase plus importante que la plante 1. Ainsi un nombre de copie élevé n'implique pas nécessairement une augmentation de l'expression du gène. Ceci peut être attribué à des effets de position du fait de l'influence du site d'intégration sur l'expression des gènes introduits (Blaich, 1992; Stefanov *et al.*, 1994). Comme les insertions des transgènes sont différentes les copies du gène *uidA* peuvent être intégrées à proximité d'un promoteur fort ou d'une séquence de régulation qui exerce un effet négatif ou positif sur l'expression.

L'analyse fluorimétrique montre, chez les feuilles de chicorée, une induction du promoteur 35S par l'auxine. En effet, l'expression du gène *uidA* est augmentée par un facteur de 1,5 par rapport au transformé non traité. Comme le domaine B du promoteur 35S gouverne l'expression du gène *uidA* dans les feuilles du tabac, il est fort probable que ce domaine est induit chez la chicorée par l'auxine. Par ailleurs, les travaux de Benfey et Chua, (1989) et de Benfey *et al.*, (1990) ont mis en évidence des interactions additives et synergiques entre les différents sous-domaines du promoteur 35S chez le tabac. Ainsi, chez la chicorée, l'action des séquences du domaine B du promoteur 35S se combinent entre elles, provoquant une réponse rapide et sensible à l'auxine.

Dans le bouton floral, l'expression est présente dans les tissus vasculaires de l'ovaire et des anthères. Ici encore, on rencontre une expression dépendante du stade de développement. En effet, les jeunes anthères des boutons floraux fermés présentent une activité GUS au niveau de leurs assise mécanique. Cependant cette activité est absente dans les anthères matures quand la fleur est ouverte. Par ailleurs, le pollen manifeste très faiblement l'activité GUS. Le promoteur 35S CaMV ne permet pas l'expression du gène *uidA* dans le pollen de la chicorée. Des observations identiques ont été faites sur le pollen de tabac transformé par la construction CaMV 35S *uidA* (Twel *et al.*, 1989), du riz Terada et Shimamoto, (1990), de pétunia de Mascarenhas et Hamilton, (1992) et du maïs. (Hamilton *et al.*, 1992). De même un faible taux d'expression du gène CaMV 35S *uidA* a été trouvé dans les jeunes microspores d'oeillets transgéniques et aucune réaction positive n'a été signalée dans le pollen mature (Lu *et al.*, 1991).

Chez le tabac, le riz et le maïs, l'expression GUS est détectée quand un promoteur d'un gène exprimé spécifiquement dans le pollen est employé. Twel *et al.* (1991) ont montré sur le promoteur du gène LAT 56 de la tomate qui s'exprime préférentiellement dans le pollen, l'existence d'une séquence TGTGG qui augmente le taux d'expression. Cette séquence pourrait agir comme une séquence "enhancer" d'un promoteur de pollen tronqué ou d'un

promoteur hétérologue comme le CaMV 35S. Deux motifs de cette séquence ont été trouvés dans le promoteur du gène Zm13 du maïs responsable d'une expression dans le pollen (Hamilton *et al.*, 1992). Cette séquence est identique celle dite G-box qui est associée à plusieurs promoteurs de plantes comme ceux des gènes de l'alcool déshydrogénase du maïs et d'*Arabidopsis* (Frel and Nick, 1986 ; McKendree *et al.*, 1990). Il n'est pas encore clair si ces séquences agissent spécifiquement sur le promoteur du pollen, ou si leur action est d'amplifier l'expression en présence du promoteur spécifique du pollen.

Une très faible expression du gène *uidA* dans le pollen de la chicorée a été aussi observé lorsque le promoteur TR a été utilisé. On peut se demander si l'absence de l'expression est liée à une mise au repos des noyaux végétatifs et reproducteurs qui ne seraient activés que lors de la germination. Des résultats qui vont dans ce même sens ont été observés avec le pollen de tabac où l'expression est silencieuse dans le grain de pollen mature mais devient forte au moment de la germination. Le repos des noyaux du pollen pourrait être expliqué par la structure de la chromatine. En effet, chez le tabac le noyau reproducteur du pollen a un faible volume. La taille réduite du noyau reproducteur est probablement due à une structure compacte de la chromatine. Enfin, la quantité des facteurs de transcription nécessaires pour l'activité du promoteur est probablement très faible pour provoquer une expression dans le pollen.

Contrairement au gamétophyte mâle, le gamétophyte femelle présente une activité GUS dans tous ses tissus. En effet, l'expression du gène *uidA* est présente dans le sac embryonnaire, dans le nucelle, dans le tissu vasculaire du raphé et du stigmate.

Il apparaît clairement que le promoteur 35S ne peut pas être considéré comme constitutif, puisque son expression est dépendante du tissu et du stade de développement de la plante. De plus, le promoteur 35S est induit dans les feuilles et dans les racines par l'auxine. Par ailleurs, il a été démontré que le promoteur 35S contient des domaines et des sous-domaines qui confèrent une expression spécifique du tissu et du stade de développement chez le tabac (Benfey *et al.*, 1989 ; Benfey et Chua, 1989).

Au niveau cellulaire, l'expression de la β -glucuronidase semble être localisée dans le cytoplasme des chicorées transgéniques. Cette présence cytoplasmique a été également rapportée chez le haricot (Franklin *et al.*, 1993). Cependant, Murakami *et al.* (1992) ont montré chez le tabac transformé par la construction PR-*uidA* ou par CaMV 35S-*uidA* que la β -glucuronidase se trouve dans la vacuole. D'après ces auteurs, la localisation de la β -

glucuronidase dans la vacuole se fait en deux étapes. D'abord, la protéine est synthétisée dans le cytoplasme. Ensuite, quand l'activité GUS est importante, la protéine est déversée dans la vacuole. Un cas similaire a été rapporté par Halperin (1969) a propos de la phosphatase acide. Cette protéine, résistante aux attaques des protéases endogènes, se trouve dans des inclusions contenues dans la vacuole. Ces inclusions sont apparentées aux inclusions vacuolaires renfermant la β -glucuronidase chez le tabac transformé. D'après Murakami *et al.* (1992), comme la vacuole est un lieu de dégradation et d'accumulation de plusieurs métabolites (Nishimura et Beevers, 1979), il serait tout a fait possible que la β -glucuronidase, protéine bactérienne étrangère, se déverse dans la vacuole où elle s'accumule dans des inclusions denses. Il est probable que, chez la chicorée, l'expression de la β -glucuronidase est vacuolaire. En effet, dans les cellules matures, la vacuole occupe un grand volume de la cellule. Ceci qui peut donner une apparente localisation de la β -glucuronidase dans le cytoplasme. Afin de confirmer ceci, il faudrait utiliser les techniques de plasmolyse en employant des colorant de la vacuole.

3. Test NPTII

Certaines plantes transformées ont été testées pour l'activité NPTII. L'enzyme a été détectée dans ces plantes. Cependant, nous avons observé une variation de l'expression entre les transformants. En effet, la plante 5 issue d'une transformation par la construction pTDE4 présente une activité NPTII plus importante que les autres transformants issus de la même construction. Cette variation peut s'expliquer de différentes façons :

- elle peut refléter les modifications post-transcriptionnelles suggérées par certains auteurs (Paszkowski *et al.*, 1984),
- comme l'insertion de l'ADN-T s'effectue au hasard, l'inactivation ou la très faible expression d'un gène peut être liée à des effets de position,
- l'expression du gène peut être soumise à une régulation par des processus de méthylation (Weising *et al.*, 1988 ; Hepburn *et al.*, 1988). En effet, plusieurs auteurs rapportent que le gène *nptIII* est facilement inactivé par méthylation (Matzke *et al.*, 1989 ; Kilby *et al.*, 1992).

Toutefois, le test NPTII montre que le gène *nptIII* s'est exprimé et que l'ADN-T transféré est bien intégré dans le génome végétal. De plus, toutes les plantes testées pour la

présence du gène *ntpII* ont un test GUS positif, ce qui prouve que le transfert des deux gènes marqueurs au sein du génome des plantes transgéniques a été réalisé.

4. Caractérisation moléculaire des plantes transgéniques

Les résultats de l'analyse moléculaire de plusieurs plantes transformées par la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant le vecteur pTDE4 montrent que le nombre de copies de l'ADN-T intégrées dans le génome varie de une à cinq copies. Certaines copies sont incomplètes ou réarrangées. Les plantes analysées présentent des insertions de l'ADN-T à différents endroits. Ce qui confirme que l'ADN est transféré dans des sites différents du génome des plantes et que *Agrobacterium* peut transférer une seule ou plusieurs copies de l'ADN-T. Certaines copies peuvent être partielles ou réarrangées. Les délétions ou les réarrangements de l'ADN-T avoir lieu au moment du transfert : soit dans la bactérie lors du transfert comme cela a été suggéré par van Lijsebettens *et al.* (1986), soit dans la plante, soit enfin au cours d'une intégration aberrante. Suite à ces événements, des sites de restriction peuvent être perdus et des copies d'ADN-T modifiées peuvent être intégrées. Des observations identiques ont été rapportées par d'autres auteurs (Spielmann et Simpson, 1986 ; Battraw et Hall, 1990 ; Busing et Benbow 1994). Les analyses moléculaires suggèrent que les délétions sont distribuées le long de l'ADN-T et ne sont pas limitées à des régions précises. En effet, les délétions concernent aussi bien les régions à proximité du bord gauche (plantes 3, 5 et 6) que les régions du côté du bord droit (plantes 1 et 2). Toutefois, il faut signaler que les séquences du côté du bord gauche est souvent le site de délétions (Gheysen *et al.*, 1987). Des délétions internes provoquant des pertes de sites (copie à 11,5 Kb de l'ADN-T des plantes 1 et 2) pourront avoir lieu au cours de la transformation. La plante 7 contient un ADN-T complet entre les deux bords.

Suite à ces événements, l'expression des gènes pourrait être influencée par les séquences d'ADN adjacentes, par le phénomène de réarrangement, par la méthylation de l'ADN-T inséré et par le nombre de copies présentes dans le génome végétal. Souvent les plantes ayant un nombre de copies élevées montrent un faible taux d'expression du gène introduit (Hobbs *et al.*, 1990 ; Last et Gray, 1990 ; Meyer *et al.*, 1992).

L'analyse moléculaire des plantes transformées par la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* ayant le vecteur pGSGLUC1 ne montre pas de délétions dans l'ADN-T. Dans certains cas une copie de l'ADN-T complète a été détectée (plantes 8 et 9).

5. Transmission du caractère résistance à la kanamycine

L'hérédité du caractère résistance à la kanamycine a été étudiée chez 7 plantes : dont 5 ont été transformées par la construction pTDE4 et 2 par la construction pGSGLUC1. D'après l'analyse de la descendance issue de l'autofécondation des plantes primaires, la ségrégation est de type 3:1 dans 57% des cas (incluant les deux plantes transformées par le vecteur pGSGLUC1 et trois plantes transformées par le vecteur pTDE4). Cette ségrégation indique l'insertion en locus soit d'un allèle fonctionnel et dominant pour le gène introduit soit d'une insertion multiple en tandem de l'ADN-T (Zambryski *et al.*, 1980 ; Holsters *et al.*, 1982). Toutes ces plantes ont, d'après l'analyse moléculaire, une seule copie du gène *nptII* ; l'intégration du gène s'est donc faite en un seul locus. Chez ces plantes, le gène *nptII* est donc conservé durant la méiose et est exprimé dans leurs progénitures.

Les autres plantes testées ne ségrègent pas selon les proportions attendues. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées, à savoir :

- la perte de gènes marqueurs de génération en génération entraîne une ségrégation qui ne peut pas être expliquée par l'hérédité mendélienne attendue. Des cas identiques ont été décrits par plusieurs auteurs (Deroles et Gardner, 1988 ; Heberle-Bors *et al.*, 1988 ; Buising et Benbow, 1994),

- le gène marqueur a pu être perdu dans les gamètes. Pour vérifier cette hypothèse chez la chicorée il aurait fallu faire une analyse moléculaire de la descendance des plantes présentant cette aberration et la comparer à celle des parents,

- il est également probable que l'expression du gène est réprimée dans la graine. Cette répression pourrait être due à une inactivation du transgène par méthylation. Pour éviter ce problème, surtout pour les plantes ayant un nombre important de copies de l'ADN-T, il aurait fallu faire germer les graines sur un milieu sans kanamycine, puis une fois que les plantules étaient développées, ajouter de la 5-AZA cytidine en plus de la kanamycine afin de ne pas sous-estimer les proportions de la ségrégation,

- les plantes peuvent être chimériques. Certaines cellules sont transformées d'autres ne le sont pas. Le gène de résistance est dilué ou perdu lors des divisions,

- enfin l'ADN-T peut induire des mutations létales dans les gamètes. Les proportions que nous avons trouvées pour les plantes dont la ségrégation est non mendélienne sont en accord avec cette dernière hypothèse. En effet, les plantes 1 et 2 ont des proportions de ségrégation d'un gène létales. Le test statistique G confirme l'homogénéité dans ces proportions pour ces plantes. Il serait très intéressant d'analyser la descendance de ces plantes pour déterminer l'existence éventuelles de plantes homozygotes pour l'ADN-T. Toutes les plantes présentant une résistance à la kanamycine ont une activité GUS positive. Le gène *uidA* coségrège avec le gène *nptII*.

IV. Transformation par électroporation

En ce qui concerne l'électroporation des protoplastes de chicorée, un protocole a été établi pour mesurer l'expression transitoire. Cependant, la méthode nécessite d'être optimisée pour une meilleure expression des transgènes. Un compromis entre la concentration plasmidique, la présence de l'ADN entraîneur et le pourcentage de viabilité après électroporation est nécessaire pour une meilleure fréquence d'expression transitoire. Dans la plupart des cas d'électroporation, une viabilité de plus de 50% donne généralement un meilleur résultat. Chez la chicorée, il aurait fallu, pour augmenter l'expression transitoire chez les protoplastes, tester une intensité de voltage de 250 V/cm et procéder à l'électroporation en présence du PEG. Le PEG permet une association de l'ADN plasmidique aux membranes cellulaires (Shillito *et al.*, 1985) et facilite l'entrée de l'ADN dans les protoplastes. Le substrat X-GLUC présente une certaine toxicité pour les protoplastes de la chicorée. La population de protoplastes est constituée par de protoplastes de grande taille et par des protoplastes de petite taille. Après le test GUS, les cellules bleues de petites tailles étaient en très mauvais état physiologique. Elles sont fortement collapsées, ce qui pourrait donc être responsable d'une sous-estimation des cellules bleues dénombrées. Il aurait fallu tester le substrat MUG, qui est beaucoup plus sensible que le substrat X-GLUC et qui permet une meilleure quantification de l'expression.

En conclusion, l'électroporation est une méthode efficace pour l'introduction des transgènes. Elle permet l'expression des gènes introduits 48 h après le choc électrique. Le promoteur (35S CaMV) que nous avons utilisé nous a permis de détecter l'expression du gène. L'expression paraît stable dans les cellules puisqu'elle persiste dans les microcals. Cette méthode pourra permettre d'évaluer rapidement de nouveaux vecteurs pour leur expression

dans les cellules de chicorée et d'étudier les effets environnementaux sur l'activité des promoteurs de plantes comme ceux de la nitrate réductase et de l'acétolactate synthase. Elle permettra aussi d'envisager une régénération des plantes stablement transformées.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons mis au point un protocole de transformation de la chicorée de Bruxelles par *Agrobacterium tumefaciens*. Nous avons voulu déterminer quels étaient les tissus qui permettaient d'obtenir le rendement de transformation le plus élevé possible. Nous avons le choix entre des tissus prélevés sur des racines tubérisées capables de régénérer des pousses feuillées lorsqu'ils sont cultivés sur un milieu nutritif simple et des tissus foliaires et cotylédonaire exigant des milieux plus riches contenant en particulier des facteurs hormonaux.

Les essais effectués avec des explants racinaires n'ont pas conduit à des résultats satisfaisants puisque l'expression des transgènes est transitoire. Les observations en microscopie électronique par balayage ou par transmission montrent que les bactéries sont capable d'adhérer aux tissus racinaires. Ainsi, l'impossibilité d'obtenir des transformants où le caractère introduit s'exprime durablement est sans doute dû à une incompetence des tissus racinaires à la transformation. Cette incompetence semble être attribuée à la présence de cellules cambiales qui possèdent des caractéristiques de cellules méristématiques.

Or de nombreux auteurs (Potrykus *et al.*, 1990 ; Sangwan *et al.*, 1992) ont montré que les cellules méristématiques ne possèdent pas une aptitude élevée à la transformation. La mise en culture de tels explants provoque une prolifération de ces cellules cambiales alors que les autres tissus parenchymateux ne se différencient pas, sans doute à cause d'une absence d'hormones dans le milieu de culture. Par conséquent, nous avons abandonné la transformation de ces tissus et avons utilisé des fragments foliaires et cotylédonaire. Les résultats obtenus, montrent que les tissus cotylédonaire présentent une meilleure aptitude à la transformation que les tissus foliaires à la condition que ces cotylédons soient prélevés sur des plantules étiolées et que la coculture se fasse en présence de 100 μ M d'acetosyringone.

L'analyse en microscopie électronique à balayage et par transmission a montré que la densité bactérienne sur les cotylédons est très élevée. Cette observation confirme les résultats de la transformation de ce type d'explants. D'une façon surprenante une étape de préculture des tissus cotylédonaire, loin d'améliorer le rendement de la transformation, le fait au contraire diminuer. On constate que, des cals résistants sont induits mais ne régènèrent pas tous des bourgeons.

Récemment, certains auteurs (Zhu *et al.*, 1992, Carpita *et al.*, 1993) ont montré l'existence, chez les végétaux, dans la matrice extracellulaire, de protéines de surface de type

vitronectine et fibronectine. Wagner et Matthysse, (1992) ont émis l'hypothèse que l'accrochage des bactéries aux cellules végétales se fait par l'intermédiaire de ces récepteurs. Afin de mettre en évidence l'existence de ces protéines dans les tissus de la chicorée, nous avons utilisé des anticorps antifibronectine et antivitronectine qui reconnaissent des fibronectines ou des vitronectines humaines. L'analyse en microscopie à fluorescence a montré l'existence de protéines de type vitronectine dans les feuilles et dans les cotylédons, mais pas dans les racines. Cependant, la fluorescence étant plus forte dans les explants foliaires. Aussi avons nous tenter de localiser ces protéines sur des coupes minces effectuées sur des explants foliaires avec ou sans préculture. Il semble qu'une étape de préculture n'augmente pas la production de ce type de protéines. La fluorescence est visible dans les parois et surtout dans des structures discrètes, semblables à de longs saccules qui pourraient être des dictyosomes. Nous supposons que ces structures contiennent donc des protéines de type vitronectine exocytées vraisemblablement dans la matrice extracellulaire. Par contre nous n'avons pas mis en évidence de protéines de types fibronectine. Ou bien celles ci sont en faible quantité dans la chicorée, ou bien les anticorps utilisés ne reconnaissent pas des protéines appartenant aux fibronectines de cette espèce. La mise en évidence de molécules types fibronectines chez les cellules de tabac semble être en relation avec le stress causé par la présence de NaCl 0,75M (Zhu *et al.*, 1992). Il serait intéressant de vérifier s'il existe une relation entre l'effet de stress et la synthèse de ces protéines chez la chicorée.

L'analyse histochimique des bourgeons transformés issus des explants foliaires et cotylédonaires montre une activité GUS stable dans le temps. Suivant le promoteur utilisé et selon le stade de développement des plantes de la chicorée, le gène *uidA* s'exprime différemment. Sous le promoteur TR2', l'expression de la β -glucuronidase est localisée dans les tissus vasculaires des parties aériennes de la plante. Dans la racine l'expression est limitée à son apex. Dans sa zone d'élongation et de différenciation, l'expression est importante dans les couches externes. Dans les régions adultes, elle est limitée à la couche la plus externe du cortex. Par conséquent, les gènes placés sous le contrôle de TR s'expriment de façon spatio-temporelle. De plus, son expression est également sous le contrôle de divers facteurs de croissance (AIA, 2,4-D, BAP, ABA).

Le promoteur TR est également régulé par des blessures et par le stade de développement des plantules. Les jeunes cotylédons présentent une activité GUS intense comparée aux cotylédons âgés. Au contraire, les jeunes feuilles présentent moins d'activité GUS que les feuilles adultes. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le promoteur TR comprend des sous-domaines qui gouvernent l'expression des gènes qu'il contrôle, spécifiquement dans

divers tissus. On retrouve ce genre de contrôle de l'expression dans les tissus de différents organes néoformés de la chicorée.

En ce qui concerne le promoteur 35 S CaMV, l'expression du gène *uidA* est présente dans de nombreux tissus. Cependant, quelques variations d'expression sont détectées dans les racines. Lorsqu'elles sont âgées, elles n'expriment pas le gène *uidA* dans leurs tissus vasculaires, Ce qui peut être attribué à une quantité insuffisante de facteurs de transcription qui déclenchent l'expression dans les tissus conducteurs. De plus, dans les racines âgées, l'apex racinaire ne montre pas d'activité β -glucuronidase. Dans les feuilles, le promoteur 35 S est régulé par le stade de développement. L'expression est très importante dans les feuilles âgées. De plus, le promoteur 35 S est induit par le 2,4-D. Cette induction est faible comparée à celle du promoteur TR.

L'analyse biochimique de cinq plantes transformées par la souche pTDE4 et deux plantes transformées par la souche pGSGLOC1 a montré une activité NPTII chez ces plantes. L'hybridation moléculaire avec une sonde issue du gène *uidA* ou *nptII* a confirmé l'intégration des transgènes. On compte de 1 à 5 insertions selon les plantes testées. Plusieurs plantes semblent présenter des réarrangements de plusieurs copies de l'ADN-T inséré, ainsi que des délétions dans certaines de copies qui ont pu se produire soit au moment du transfert de l'ADN-T de la bactérie aux cellules, soit au moment de son intégration dans le génome végétal.

L'étude de la transmission du caractère de résistance à la kanamycine suit les proportions mendélienne de ségrégation dans 57% des cas. Dans le reste des plantes testées, les fréquences sont inversées ce qui suggère que la résistance à la kanamycine est transmise comme un caractère létal dominant.

Nous avons donc mis au point un protocole simple et reproductible de transformation de la chicorée. De plus, nous avons démontré que la chicorée est sensible à plusieurs souches d'*Agrobacterium tumefaciens* (pTDE4, pGSGLOC1 et pVDH1124). La maîtrise d'une méthode de transformation est importante pour la chicorée. Elle permettra le transfert des gènes d'intérêt agronomique tel le gène de l'acetolactate synthase, qui est la première enzyme intervenant dans la synthèse de la valine, de la leucine et de l'isoleucine, en cours de clonage dans le laboratoire.

Parallèlement au transfert indirect de gènes, nous avons abordé une méthode de transfert direct par électroporation des protoplastes de chicorée. Les essais effectués sur les protoplastes n'ont permis d'obtenir qu'un faible nombre de cellules exprimant le gène *uidA*. La

meilleure fréquence de transformation ($1,5 \cdot 10^{-4}$) a été obtenue pour des concentrations élevées de plasmide à transférer (75 µg de plasmide). De plus, il est probable que le nombre de cellules exprimant le gène *uidA* est sous estimé. Certaines cellules présentant une coloration bleue n'ont pas été retenues, lors du dénombrement des cellules transformées. En effet, après la réalisation du test GUS, on observe que certaines cellules étaient fortement collapsées ou que d'autres cellules de petite taille présentaient une coloration bleue intense et un contenu cellulaire qui était de toute évidence en mauvais état. Ces effets pourraient être dus à un effet toxique du substrat X-GLUC, sur les cellules.

L'électroporation nécessite d'être optimisée pour définir les meilleurs paramètres permettant d'obtenir un taux élevé de protoplastes exprimant le gène *uidA*. De même, l'utilisation du substrat MUG nous permettra de mieux quantifier l'expression du gène *uidA*. Ainsi, cette technique pourra être utilisée pour étudier les promoteurs de la nitrate réductase et de l'acétolactate synthase qui sont en cours d'isolement dans le laboratoire.

La transformation génétique de la chicorée peut désormais se poursuivre dans deux voies :

D'abord, dans la recherche de cellules compétentes à la transformation. Des études récentes (Sangwan *et al.*, 1992) faites sur *Arabidopsis thaliana* ont montré qu'après une période de préculture certaines cellules acquièrent la compétence à la transformation. A l'image de cette étude remarquable, il serait intéressant de localiser le type de cellules aptes à la transformation et de déterminer la nature des facteurs qui permettent d'acquérir la compétence à la transformation.

Ensuite, la recherche peut être également dirigée vers la détermination chez la chicorée d'éventuels sites spécifiques de liaison avec les agrobactéries impliquant les protéines de surface. Récemment, Swart *et al.*, (1992) ont mis en évidence chez le pois, le récepteur à la rhicadésine permettant l'attachement d'*Agrobacterium* à la surface de la plante. Des protéines de surface, telles que les protéines type vitronectine qui ont été mises en évidence dans les tissus foliaires de la chicorée peuvent probablement être considérées effectivement comme des protéines de liaison. La détermination du mécanisme de transport de l'ADN-T dans le cytoplasme et du cytoplasme dans le noyau est aussi une voie à explorer.

Certaines chicorées transgéniques issues de la génération F1 montrent un phénotype particulier. En effet, ces plantes ont une taille réduite et leurs feuilles sont gaufrées. L'analyse moléculaire de cette descendance est nécessaire afin de déterminer le profil d'insertion de l'ADN-T et de le comparer à celui des parents. Nous devrions réaliser des tests sur les autres

Conclusion générale et perspectives

plantes obtenues et étudier la transmission du caractère de résistance à la kanamycine dans la génération F2. Il sera également intéressant de déterminer si l'insertion de l'ADN-T se maintient au fil des générations successives.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Albano M, Breitling R, Dubnau DB (1989) Nucleotide sequence and genetic organization of the *Bacillus subtilis comG* operon. J. Bacteriol. 171, 5386-5404
- Alwen A, Benito-Moreno RM, Vicente O, Heberle-Bors E (1992) Plant endogenous β -glucuronidase activity : how to avoid interference with the use of the E.coli β -glucuronidase as a reporter gene in transgenic plants. Trans. Research 1, 63-70
- An G (1985) High efficiency transformation of cultured tobacco cells. Plant Physiol. 79, 568-570
- An G, Watson BD, Chiang CC (1986) Transformation of tobacco, tomato, potato, and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system. Plant Physiol. 81, 301-305
- Antequera F, Bird AP (1988) Unmethylated CpG islands associated with genes in higher plant DNA. EMBO J. 7, 2295-2299
- Assad-Garcia N, Ochoa-Alejo N, Garcia-Hernandez E, Herrera-Estrella L, Simpson J (1992) *Agrobacterium*-mediated transformation of tomatillo (*Physalis ixocarpa*) and tissue specific and developmental expression of the CaMV 35S promoter in transgenic tomatillo plants. Plant Cell Rep. 11, 558-562
- Aoyama T, Takanami M, Makino K, Oka A (1991) Cross-talk between the virulence and phosphate regulons of *Agrobacterium tumefaciens* caused by an unusual interaction of the transcriptional activator with a regulatory DNA element. Mol. Gen. Genet. 227, 385-390
- Baribault TJ, Skene KGM, Cain PA, Scott NS (1990) Transgenic grapevines: Regeneration of shoots expressing β -glucuronidase. J. Exp. Bot. 41, 1045-1049
- Battraw M, Hall TC (1992) Expression of a chimeric neomycin phosphotransferase II gene in first and second generation transgenic rice plants. Plant Sci. 82, 191-202
- Battraw MJ, Hall TC (1990) Histochemical analysis of CaMV 35S promoter- β -glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. Pl. Mol. Biol. 15, 527-538
- Baumann G, Raschke E, Bevan M, Schoffl F (1987) Functional analysis of sequences required for transcriptional activations of a soybean heat shock gene transgenic tobacco plants. EMBO J. 6, 1161-1166

- Benfey P, Ren L, Chua N-H (1989) Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains. *EMBO J.* 8, 1685-1696
- Benfey P, Chua N-H (1989) Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244, 174-181
- Benfey P, Chua, N-H (1990) Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244, 174-181
- Berry-Lowe S L, Mc Knight TD, Shah DM, Meagher RB (1982) The nucleotide sequence, expression, and evolution of one member of a multigene family encoding the small subunit of ribulose 1,5 biphosphate carboxylase in soybean. *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 483-498.
- Bilang R, Peterhans A, Bogucki A, Paszkowski J (1992) Single-stranded DNA as a recombination substrate in plants as assessed by stable and transient recombination assays. *Mol. Cellular. Biol.* 12(1), 329-336
- Binns AN (1990) *Agrobacterium*-mediated gene delivery and the biology of host range limitations. *Physiol. Plant.* 79, 135-139
- Binns AN (1991) Transformation of wall deficient cultured tobacco protoplasts by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant. Physiol.* 96, 496-506
- Blaich R (1992) Function of genetic material: activity of genes in a transgenic plants. *Prog. Bot.* 53, 207-220
- Bochardt A, Hodal L, Palmegren G, Mattsson O, Okkels FT (1992) DNA methylation is involved in maintenance of an unusual expression pattern of an introduced gene. *Plant Physiol.* 99, 409-414
- Bolton GW, Nester EW, Cordon MP (1986) Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. *Science* 232, 983-985
- Bourbouloux A, Bonnemain JL (1974) Transport, distribution et métabolisme de l'auxine dans la racine de *Vicia faba* L. après application de [¹⁴C] AIA ou de [¹³H] AIA sur le bourgeon. *Planta* 119, 169-182
- Bower R, Birch RG (1992) Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *Plant J.* 2, 409-416.

- Bradford NM (1976) A rapid and sensitive method for the detection of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 753-760
- Brown PTH (1989) DNA methylation in plants and its role in tissue culture. *Genome* 31, 717-729
- Brwen TA (1991) *Molecular Biology Labfax*
- Buising CM, Benbow RM (1994) Molecular analysis of transgenic plants generated by microprojectile bombardement: effect of petunia transformation booster sequence. *Mol. Gen. Genet.* 243, 71-81
- Caboche M, Deshayes A (1984) Utilisation de liposomes pour la transformation de protoplastes de mesophylle de tabac par un plasmide recombinant d'E.coli leur conférant la résistance à la kanamycine C.R. Acad. Sci. Paris série III 299, 663-666
- Cangelosi GA, Ankenbauer RG, Nester EW (1990) Sugars induce the *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 6708-6712
- Cangelosi GA, Hung L, Puvanesarajah V, Stacey G, Ozga DA, Leigh JA, Nester EW (1987) Common loci for *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide synthesis and their roles in plant interactions. *J. Bacteriol.* 169, 2086-2091
- Cangelosi GA, Martinetti G, Leigh JA, Lee CC, Theins C, Nester EW (1989) Role of *Agrobacterium tumefaciens* ChvA protein in export of β -1,2-glucan. *J. Bacteriol.* 172, 2172-2174
- Carpenter JL, Ploense SE, Peter Snustad D, Silflow CD (1992) Preferential expression of an α -tubulin gene of *Arabidopsis* in pollen. *The Plant Cell* 4, 557-571
- Cashmore A R (1983) Nuclear genes encoding the small subunit of ribulose-1,5- biphosphate carboxylase. In : Kosuge, T. , Merredith, C. P. Hollaender, A.(eds) "Genetic Engineering of Plants -an agricultural perspective", pp. 29-38. NY Plenum Press.
- Castresana C, Garcia-Luque I, Alonso E, Malik VS, Cashmore AR (1988) Both positive and negative regulatory elements mediate expression of a photoregulated *CAB* gene from *Nicotiana plumbaginifolia*. *EMBO. J.* 7, 1929-1936

- Chriqui D, David C, Adam S (1988) Effects of differentiated or dedifferentiated state of tobacco pith tissue on its behaviour after inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Rep. 7, 111-114
- Christen AA, Montalbano B (1988) An ethidium-bromide agarose plate assay for the non-radioactive detection of cDNA. Anal. Biochem. 178, 269-272
- Christie PJ, Ward JE, Gordon MP, Nester EW (1989) A gene required for transfer of T-DNA to plants encodes an ATP-ase with autophosphorylating activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 9677-9681
- Christie PJ, Ward JE, Winans SC, Nester EW (1988) The *Agrobacterium tumefaciens virE* gene product is a single-strand-DNA-binding protein that associates with T-DNA. J. Bacteriol. 170, 2659-2667
- Christou P, Ford TL, Kofron M (1991) Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. Bio/Tech. 9, 957-962
- Chyi YS, Jorgensen RA, Goldstein D, Tanksley SD (1986) Loaiza-Figueroa L. Locations and stability of *Agrobacterium*-mediated T-DNA insertions in the *Lycopersicon* genome. Mol. Gen. Genet. 204, 64-69
- Citovsky V, DeVos G, Zambryski P (1988) Single stranded DNA binding protein encoded by the *vir E* locus of *Agrobacterium tumefaciens*. Science 240, 501-504
- Colot V, Robert LS, Kavanagh TA, Bevan MW, Thompson RD (1987) Localization of sequences in wheat endosperm protein genes which confer tissue-specific expression in tobacco. EMBO J. 6, 3559-3564
- Crepy L, Chupeau M, Chupeau Y (1982) The isolation and culture of leaf protoplasts of *Cichorium intybus* and their regeneration into plants. Z. Pflanzenphysiol. 107, 123-131
- Crossway A, Oakes JV, Irvine JM, Ward B, Knauf BC, Schewmaker CK (1986) Integration of foreign DNA following micro-injection of tobacco mesophyll protoplasts. Mol. Gen. Genet. 202, 179-185
- Curtis IS, Power JB, McCabe M, de Laat AMM, Davey MR (1994) Promoter-GUS fusions in lettuce. 4th international congress of Plant Molecular Biology. Amsterdam, June 19-24

- Das A (1988) The *Agrobacterium tumefaciens* vir E operon encodes a single strand DNA binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 2609-2913
- Das A, Pazour GJ (1989) Delineation of the regulatory region sequences of *Agrobacterium tumefaciens* vir B operon. Nucleic. Acids. Res.17, 4541-4550
- Davey MR, Coccking GE, Freeman J, Pearce N, Tudor I (1980) Transformation of plant protoplast with Ti-plasmid DNA. Nature 296, 72-74.
- Davey MR, Rech EL, Mulligan BJ (1989) Direct DNA transfer to plant cells. Plant Mol. Biol.13, 273-285
- Dazzo FB, Brill WJ (1979) Bacterial polysaccharide which binds *Rhizobium trifolii* to clover root hair.J. Bacteriol. 137, 1362-1373
- De Framond A, Barton KA, Chilton M-D (1983) Mini-Ti: a new vector strategy for plant genetic engineering. Bio/Tech. 1, 262-269
- Dean C, Jones J, Favreau M, Dunsmuir P (1988) Influence of flanking sequences on variability in expression levels of introduced gene in transgenic tobacco plants. Nucl. Acids Res. 16, 9267- 9283
- Deblaere R, Byteber B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J (1985) Efficient atropine Ti-plasmid derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. Nucl. Acid Res. 13, 4777-4788
- Dellaporta S, Wood J, Hick J (1983) A plant DNA minipreparation; version II. Pl. Mol. Biol. R 1, 19-21
- Deshayes A, Herrera-Estrella L, Caboche M (1985) Liposome-mediated transformaton of tobacco mesophyll protoplasts by an *E. coli* plasmid. EMBO J. 4, 2731
- Deroles SC, Gardner RC (1988) Analysis of T-DNA structure in large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. Pl. Mol. Biol. 11, 365-377
- Dhir KS, Dhir S, hepburn A, Widholm J (1991) Factors affecting transient gene expression in electroporated *Glycine max* protoplasts. Plant cell Rep. 10, 106-110

- Dong JZ, McHughen A (1991) Patterns of transformation intensities on flax hypocotyls inoculated with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 10, 61-71
- Dorchies V. et Rambour S. (1983) Activité nitrate réductase mesuré *in vivo* chez *Cichorium intybus* (var. Witloof) au cours du forçage. Physiol. Vég. 21, 705-713.
- Dorchies V. et Rambour S. (1985) Activité nitrate réductase chez *Cichorium intybus* (var. Witloof) à différents stades de développement et dans les tissus cultivés *in vitro*. Physiol. Vég. 23, 25-35.
- Douglass C, Halperin W, Nester EW (1982) *Agrobacterium tumefaciens* affected in attachment to plant cells J. Bacteriol 152, 1265-1275
- Draper, J., Davey M R, Freeman J P, Cocking E C Cox B J (1982) Ti-plasmid homologous sequences present in tissues from *Agrobacterium* plasmid-transformed petunia protoplasts. Plant Cell. Physy. 23, 451-58.
- Dubois T, Duois J, Guedira M, Vasseur J. (1988) Embryogenèse somatique directe sur les styles de *Cichorium* : effets de la température et origine des embryoides. C. R. Acad. Sci. Paris 307, Série III, 669-675
- Dubois J, Wali Alami F, Vasseur J (1990) Préparation, purification et culture de protoplastes foliaires de chicorée Witloof. Bull. Soc. bot. Fr. 43, 7-16
- Eckes P, Roshal S, Schell J (1986) Isolation and characterization of a light inducible, organ-specific gene from potato and analysis of its expression after tagging and transfer into tobacco and potato shoots. Mol. Gen. Genet. 205, 14-22
- Eimert K, Siegemund F (1992) Transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) an experimental survey. Pl. Mol. Biol. 19, 485-490
- Ellis JG, Ilewellyn DJ, Dennis ES, Peacock WJ (1987) Maize Adh-1 promoter sequences control anaerobic regulation: Addition of upstream promoter elements from constitutive genes is necessary for expression in tobacco. EMBO J. 6, 11-16
- Estruch JJ, Chriqui D, Grossmann D, Shell J, Spena A (1991a) The plant oncogene rolC is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates. EMBO J. 10 (10), 2889-2895
- Estruch JJ, Shell J, Spena A (1991b) The protein encoded by the rolB plant oncogene hydrolyses indole glucosides. EMBO J. 10 (11), 3125-3128

Everett NP, Robinson KEP, Mascarenhas D (1987) Genetic engineering of sunflower (*Helianthus annuus* L.) Bio/Techn. 5, 1201-1204

Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132, 6

Feinberg AP, Vogelstein B (1984) Addendum: a technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 137, 266

Filipone E, Lurquin PF (1989) Stable transformation of eggplant (*Solanum melangena* L.) by cocultivation of tissues with *Agrobacterium tumefaciens* carrying a binary plasmid vector. Plant Cell Rep. 8, 370-373

Fillati JJ, Kiser J, Rose R, Comai L (1987) Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary vector *Agrobacterium tumefaciens* vector. Bio/Techn. 5, 726-730

Fluhr R, Chua N-H (1986) Developmental regulation of two genes encoding rebulose-biphosphate carboxylase small subunit in pea and transgenic petunia plants: phytochrome responses and blue light induction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 2358-2362

Fluhr R, Kuhleimeier C, Nagy F, Chua N-H (1986) Organ specific and light-induced expression of plant genes. Science. 232, 1106-1112

Fontana SG, Santini L, Caretto S, Frugis G, Mariotti D (1993) Genetic transformation in the grain legume *Cicer arietinum* L. (chickpea). Plant Cell Rep. 12, 194-198

Franche C, Bogusz D, Schöpke C, Fauquet C, beachy RN (1991) Transient gene expression in casava using high velocity microprojectiles. Pl. Mol. Biol. 17, 493-498

Franklin CI, Trieu TN, Cassidy BG, Dixon RA, Nelson RS (1993) Genetic transformation of green bean callus via *Agrobacterium* mediated DNA transfer. Plant Cell Reports. 12, 74-79

Ferl RJ, and Nick H (1986) In vivo detection of regulatory factor binding sites in the 5' flanking region of *maize* Adh 1. J. Biol. Chem 262: 7947-7950

Fromm ME, Morrish F, Armstrong C, Williams R, Thomas J, Klein TM (1990) Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. Bio/ Tech. 8, 833-839

- Garfinkel DJ, Nester EW (1980) *Agrobacterium tumefaciens* affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. J. Bacteriol. 144, 732-743
- Garfinkel DJ, Simpson RB, Ream LW, White FF, Gordon Mp, Nester EW (1981) Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis Cell 27, 143-153
- Gheysen G, Van montagu M, Zambryski P (1987) Integration of *Agrobacterium tumefaciens* transfer DNA (T-DNA) involves rearrangements of target plant DNA sequences; proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6169-6173
- Gheysen G, Villanoel R, Van Montagu M (1991) Combination in plants: a model for T-DNA integration. Genes Dev. 5, 287-297
- Gietl C, Koukolikova-Nicola Z, Hohn B (1987) The mobilization of the T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cells involves a single DNA binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 9006-9010
- Goldfarb B, Strauss SH, Howe GT, Zaerr JB (1991) Transient gene expression of microprojectile-introduced DNA in Douglas-fir cotyledons. Plant Cell Rep. 10, 517-521
- Gordon-Kamm WJ, Spencer TM, Mangano ML, Adams TR, Daines RJ, Start WG, O'Brien JV, Chambers SA, Adams WR, Willets NG, Rice TB, Mackey CJ, Kruger RW, Kausch AP, Lemaux PG (1990) Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. Plant Cell 2, 603-318
- Goupil P, Hatzopoulos P, Franz G, Hempel FD, You R, Renee Sung Z (1992) Transcriptional regulation of a seed-specific carrot gene, DC8. Pl. Mol. Biol. 18, 1049-1063
- Graham J, McNicol RJ, Kumar A (1990) Use of the GUS-gene as selectable marker for *Agrobacterium* mediated transformation of Rubus. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 20, 35-39
- Grimesley N, Hohn T, Davis JW Hohn B (1987) *Agrobacterim* mediated delivery if infectious maize streak virus into maize plants. Nature 325, 177-179
- Gruenbaum Y, Naveh-Many T, Ceder H, Rasin A (1981) Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. Nature 292, 860-862

- Guedira M, Dubois-Tylski T, Vasseur J, Dubois J (1989) Influence du saccharose sur le rendement, la morphologie et le développement des embryons somatiques directe à partir de cultures d'anthères du *Cichorium* (Asteraceae). Can. J. Bot. 67, 970-976
- Guivarc'h A, Caissard JC, Browen S, Marie D, Dewitte W, Vanonckelen h, Chriqui D. Facteurs cellulaires et hormonaux impliqués dans les réponses de transformation par *Agrobacterium tumefaciens*. Premier forum de jeine chercheurs de l'IAPTC France (p 44-48) Amiens 22/23 juin 1992.
- Guyon P, Chilton M-D, Petit A, Tempe J (1980) Agropine in "null type" crown gall tumors : evidence for the generality of the octopine concept. Proc. Natl. Acad. Sci. , USA. 77, 2693-2697.
- Halperin W (1969) Ultrastructural localisation of acid phosphatase in culture cells of *Daucus carota*. Planta (berl) 88, 91-102
- Hamilton DA, Roy M, Rueda J, Sindhu RK, Sanford J, Mascarenhas JP (1992) Dissection of a pollen-specific promoter from maize by transient transformation assays. Pl. Mol. Biol. 18, 211-218
- Harris RR, DeRobertis GA, Pierce DA, Moynihan MR, Everett MR (1990) Heterogeneity of X-GLUC staining in transgenic maize callus (abstract). In vitro Cell Dev. Biol. 26 (part II): 69
- Heberle-Bors E, Charvat B, Thompson D, Scherthaner JP, barta A, Matzke AJM, Matzke MA (1988) Genetic analysis insertions into the tobacco genome. Plant Cell Rep. 7, 571-574
- Heller R (1953) Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. Ann. Sci. Nat. Bot. Veg. 14, 1-223
- Hepburn AG (1988) DNA methylation and its effect on transformed gene expression. In :Kahl G (ed) Architecture of eucaryotic genes. VCH Weinheim, pp 419-433
- Herman L, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A (1990) Plant chromosome marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integration events. Mol. Gen. Genet. 224, 248-256
- Herrera-Estrella A, Chen Z, Van Montagu M, Wang K (1988) VirD proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are required for the formation of a covalent DNA-protein complex at the 5' end terminus of T-strand molecules. EMBO J. 7, 4055-4062

- Hidaka T, Omura M (1993) Transformation of *Citrus* protoplasts by electroporation. J. J. S. Hrt. Sci. 6(2), 371-376
- Hille J, Hoekema A, Hooykaas P, Schilperoort RA (1984) Gene organisation of the Ti-plasmid. In : Verna , D. P. S. , HOHN, Th. (eds), Genes involved in microbe- plant interactions (Plant Gene Research, VOL.1). pp 287-309, Wien-New York : Springer.
- Hobbs SLA, Kopdar P, Delong CMO (1990) The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. Pl. Mol. Biol. 15, 851-864
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir-and T-region of *Agrobacterium tumefaciens*. Nature 303, 179-180
- Holsters M, Villarroel R, Van Montagu M, Schell J (1982) The use of selectable markers for the isolation of plant DNA/T-DNA junction fragments in a cosmid vector. Mol. Gen. Genet. 185, 283-289
- Hooykaas P, Schilperoort RA (1984) The molecular genetics of crown gall tumorigenesis in molecular genetics in plants. In : Scandalios. , J. G. , (ed), Molecular genetics of plants. (Advances in Genetics, Vol, 22), pp. 209-283. New York : Academic press
- Hooykaas PJJ, Dulk-Ras HD, Schilperoort RA (1988) The *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA gene 6^b is an *onc* gene
- Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. Science. 227, 1229-1231
- Horsch RB, Klee HJ (1986) Rapid assay of foreign gene expression in leaf disc transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. role of T-DNA borders in the transfer process. Proc. Natl. Acad. Sc. USA. 83, 4428-4432
- Howard EA, Winsor BA, De Vos G, Zambryski P (1989) Activation of the T-DNA transfer process in *Agrobacterium* results in the generation of a T-strand-protein complex: Tight association of virD2 with the 5' end of T-strands. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86; 4017-4021
- Huang M-LW, Cangelosi GA, Halperin W, Nester EW (1990) A chromosomal *Agrobacterium tumefaciens* gene required for effective plant signal transduction. J. Bacteriol. 172, 1814-1822

Hynes RO (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48, 549-554

James DJ, Passey AJ, Barbara DJ, Bevan M (1989) Genetic transformation of apple *Malus pumila* Mill. using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell. Rep.* 7, 658-661

Janssen B, Gardener RC (1989) Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. *Pl. Mol. Biol.* 14, 61-72

Jasper F, Koncz C, Schell J, Steinbiss HH (1994) *Agrobacterium* T-Strand production in vitro : Sequence-specific cleavage and 5' protection of single-stranded DNA templates by purified Vir D2 protein. *Proc. Natlt. Acad. Sci. USA* 91, 694-698

Jayaswal RK, Veluthambi K, Gelvin SB, Slightom JL (1987) Double stranded T-DNA cleavage and the generation of the single stranded T-DNA molecules in *E. coli* by a virD-encoded border specific endonuclease from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 169, 5035-5045

Jefferson R, Kavanagh TA, Bevan, MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901-3907

Jin S, Christie PJ, Roitsch T, Nester EW (1990a) The regulatory VirG protein specifically binds to a cis-acting regulatory sequence involved in transcriptional activation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes. *J. Bacteriol.* 172, 531-537

Jin S, Prusti RK, Roitsch T, Ankenbauer RG, Nester EW (1990b) Phosphorylation of the vir G protein of *Agrobacterium tumefaciens* by autophosphorylated VirA protein essential role in biological activity of Vir G. *J. Bacteriol.* 172, 4945-4950

Joersbo M, Brunstedt J (1990) Direct transfer to plant protoplasts by mild sonication. *Plant Cell Rep.* 9, 207-210

Jones JDG, Dunsmuir P, Bedbrook (1985) High level expression of introduced chimaeric genes in regenerated transformed plants. *EMBO. J.* 4, 2411-2418

Jones JDG, Gilbert PE, Grady KL, Jorgensen RA (1987) T-DNA structure and gene expression in petunia plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Mol. Gen. Genet.* 207, 478-485

- Jorgensen R, Snyder C, Jones JDG (1987) T-DNA is organised predominantly in inverted repeat structures in plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Mol. Gen. Genet.* 207, 471-477
- Jouanin L, Vilaine F, Tourneur J, Tourneur C, Pautot V, Muller JF, Caboche M. (1987) Transfer of 3.4Kb fragment of TL-DNA of the *Agrobacterium rhizogenes* strain A4 confers the pRi transformed phenotype to regenerated tobacco plants. *Plant Sci.* 53, 53-63
- Kanemoto RH, Powell AT, Akiyoshi DE, Regier DA, Kerstetter RA, Nester EW, Hawes MC, Gordon MP (1989) Nucleotide sequence and analysis of the plant-inducible locus *pinF* from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 171, 2506-2512
- Kang HC, Delmotte F (1992) Caractérisation et purification de lectines de souches sauvages d'*Agrobacterium tumefaciens*. Thèse de doctorat: Biochimie/Université d'Orléans
- Katagiri F, Lam E, Chua N-H (1989) Two tobacco DNA-binding proteins have homology to CREB. *Nature* 340, 727-730
- Kavanagh TA, Jefferson RA, Bevan MW (1988) Targeting a foreign protein to chloroplasts using fusions to the transit peptide of a chlorophyll a/b protein. *Mol. Gen. Genet.* 215, 38-45
- Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327, 70-73
- Klein TM, Gradziel T, Fromm ME, Sanford JC (1988) Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. *Bio/Techn.* 6, 559-563
- Klein TM, Kornestain L, Sanford JC, Fromm ME (1989) Genetic transformation of maize cells by particle bombardement. *plant Physiol.* 91, 440-444
- Kilby NJ, Leyser HMO, Furner IJ (1992) Promoter methylation and progressive transgene inactivation in *Arabidopsis*. *Pl. Mol. Biol.* 20, 103-112
- Komari T (1989) Transformation of callus culture of nine plant species mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.* 60, 223-229
- Koncz C, Martini N, Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Körber H, Redei GP, Schell J (1989) High frequency T-DNA mediated gene tagging in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 8467-8471

- Krens FH, Mocendith L, Wuccems GT, Schilperoort RA (1982) *In vitro* transformation of protoplasts with Ti-plasmid. *Nature* 296, 72-74.
- Krens FA, Molendijk L, Wullemens GJ, Schilperoort RA (1985) The role of bacterial attachment in the transformation of cell Wall-regenerating tobacco protoplasts by *Agrobacterium tumefaciens*. *Planta* 166, 300-308
- Lam E, Benfey PN, Gilmartin PM, Fang R-Y, Chua NH (1989) Site-specific mutations alter in vitro factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86, 7890-7894
- Lampa G, Nagy F, Chua N-H (1985) Light-regulated and organ-specific expression of a wheat cab gene in transgenic tobacco. *Nature* 316, 750-752
- Langridge WHR, Fitzgerald KJ, Koncz C, Schell J, Szalay, A (1989) Dual promoter of *Agrobacterium tumefaciens* mannopine synthase gene is regulated by plant growth hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86, 3219-3223
- Last DI, Gray JC (1990) Synthesis and accumulation of pea plastocyanin in transgenic tobacco plants. *Pl. Mol. Biol.* 14, 229-238
- Lee N, Wang Y, Yang J, Huang S Tan J (1991) Efficient transformation and regeneration of rice cell groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6389-6393
- Leemans J, Deblaere R, Willimitzer L, De Greve H, Hernalsteens JP, Van Montagu M (1982) Genetic identification of function of TL-Transcripts in octopine crown gall. *EMBO J*, 1, 147-152
- Li L, Qu R, deKochko A, Fauquet C, Beachy RN (1993) An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Rep.* 12, 250-255
- Linn F, Heidmann I, Saedler H, Meyer P (1990) Epigenetic changes in the expression of the maize *A1* gene in *Petunia hybrida*: role of number of integrated gene copies and state of methylation. *Mol. Gen. Genet.* 222, 329-336
- Lippincott JA, Lippincott B (1978) Cell walls of crown-gall tumors and embryonic tissue lack *Agrobacterium* adherence sites. *Science* 199, 1075-1078

Llyod AM, Barnason AR, Rogers SG, Byrne MC, Fraley RT, Horsch RB (1986) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*. Science . 234, 464-66.

LoSchiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D, Vergara R, Orselli S, Tersì M (1989) DNA methylation of embryogenic carrots cells cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. Theor. Appl. Genet. 77, 325-331

Low KB (1988) The recombination of genetic material. Academic Press, Inc., New York.

Lowe BA, Krul WR (1991) Chemical development and genetic factors that modulate *Agrobacterium-Vitis* interaction. Plant Physiol. 96, 121-129

Lu C-Y, Nugent G, Wardley-Richardson T, Chandler SF, young R, Dalling MJ (1991) *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Bio/Techn. , 864-868

Lui X, Lam E (1994) Two binding sites for the plant transcription factor ASF-1 can respond to auxin treatments in transgenic tobacco. J. Biol. Chem. 269 (1), 668-675

Luo Z, Wu R (1989) A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. Pl. Mol. Biol. 7, 69-77

Lyznik LA, McGEE JD, Tung PY Bennetzen JL, Hodges TK (1991) Homologous recombination between plasmid DNA molecules in maize protoplasts. Mol. Gen. Genetic. 230, 209-218

Maniatis T, Fritsh EF, Sambrook J: Molecular Cloning: (1982) A laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory Press, New York

Margara J, Rancillac M (1966) Recherches expérimentales sur la néoformation de bourgeons inflorescentiels ou végétatifs in vitro à partir d'explants d'endive (*Cichorium intybus* L.). II. Observations sur la vernalisation préalable de la racine. Ann. Physiol. Vég 8, 39-47

Mascarenhas JP, Hamolton DA (1992) Artifacts in the localization of GUS activity in anthers of petunia transformed with a CaMV 35S-GUS construct. The Plant. J. 2 (3), 405-408

- Mathews H, Bharathan N, Litz RE, Narayanan NR, Rao PS, Bhatia CR (1990) The promotion of *Agrobacterium* mediated transformation in *Atropa belladonna* L. by acetosyringone. J. Plant Physiol. 136, 404-409
- Matsumoto S, Ito Y, Hosoi T, Takahashi Y, Machida Y (1990) Integration of *Agrobacterium* T-ADN into a tobacco chromosome: possible involvement of DNA homology between T-DNA and plant DNA. Mol. Gen. Genet. 224, 309-316
- Matthysse AG, Holmes HV, Gurlitz RHG (1981) Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. J. Bacteriol. 145, 583-595
- Matthysse AG (1983) Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. J. Bacteriol. 154, 906-915
- Matthysse AG (1987) Characterization of nonattaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 169, 313-323
- Matzke MA, Primig M, Trnovsky J, Matzke AJM (1989) Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. EMBO J. 8, 643-649
- Mayerhofer R, Koncz-kalman Z, Nawarath C, Bakkeren G, Cramer A, Angelis K, Redei GP, Schell J, Hohn B, Koncz C (1990) T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. EMBO J. 10, 697-704
- McCabe DE, Swain WF, Martinell BJ, Christou P (1988) Stable transformation of soybean by particle acceleration. Bio/Techn. 6, 923-926
- McCowan PP, Chen KJ, Barley CMB, Costerton JW (1978) Adhesion of bacteria to epithelial cell surfaces the reticulo-rumen of cattle. Appl. Environ. Microbiol. 35, 149-155
- McHughen A, Jordan MC (1989) Recovery of transgenic plants from "escape" shoots. Plant Cell Rep. 7, 611-614
- McKendree WL, Paul A-L, De Lisle AJ, Ferl RJ (1990) *In vivo* and *in vitro* characterization of protein interactions with the dyad G-Box of the *Arabidopsis* Adh gene. Plant Cell 2: 207-214
- Meijer FGM, Schilperoort RA, Rueb S, van Os-Ruygrok PE, Hensgens LAM (1991) Transgenic rice cell lines and plants: expression of transferred chimeric genes. Pl. Mol. Biol. 16, 807-820

- Mendel RR, Muller B, Schulze Y, Kolesnikov V, Zelenin, (1989) Delivery of foreign genes to intact barley cells by high velocity microprojectiles. *Theor. Appl. Genet.* 78, 31-34
- Meyer P, Heidmann I, Meyer zur Altenschildesche JrH, Saedler H (1992) Endogenous and environmental factors influence promoter methylation and expression of the maize *Al* gene in transgenic petunias. *Mol. Gen. Genet.* 231, 345-352
- Michlemore R, Marsh E, Seely S, Landry B (1987) Transformation of lettuce (*lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 6, 439-442
- Mittelsten Scheid O, Paszkowski J, Potrykus I (1991) Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 228, 104-112
- Morel P, Powell BS, Kado CI (1990) Characterization of three functional domains responsible for a kinase activity in VirA, a transmembrane sensory protein encoded by the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *C.R. Acad. Sci (Paris)* 310, 21-26
- Mozo T, Hooikaas PJJ (1992) Design of a novel system for the construction of vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation *Mol. Gen. Genet.* 236, 1-7
- Mukarami T, Hosokawa D, Ohashi Y (1992) The possible final localization of GUS (β -glucuronidase) reporter gene product in transgenic plants is vacuole. *Jpn. J. Crop. Sci.* 61 (3), 503-510
- Müller E, Brown PTH, Hartke S, Lörz H (1990) DNA variation in tissue culture-derived rice plants. *Theor. Appl. Genet.* 80, 673-679
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Pl.* 15, 473-497
- Nagata T, Okada K, Takebe I (1986) Strong dependency of the transformation of plant protoplasts on cell cycle. In: Kado C (ed) fallen leaf laked conference on *Agrobacterium* and crow-gall, Sept, 11-14, University of California, Davis, california, U.S.A., abstract p. 19
- Nagata T, Okada K, Kawasu T, Takebe I (1987) Cauliflower mosaic virus 35S promoter directs S phase specific expression in plant cells. *Mol. Gen. Genet.* 207, 242-244
- Nagy F, Kay S, Boutry M, Hsu M-Y, Chua N-H (1986) Phytochrome-controlled expression of a wheat Cab gene in transgenic tobacco seedlings. *EMBO. J.* 5, 1119-1124

Nagy F, Boutry M, Hsu MY, Wong M Chua NH (1987) The 5'-proximal region of the wheat Cab-a gene contains a 268pb enhancer-like sequence for phytochrome response. EMBO. J. 6, 2537-2542

Nagy F, Morelli G, Fraley RT, Rogers SG, Chua N-H (1985) Photoregulated expression of a pea *rbcS* gene in leaves of transgenic plants. EMBO J. 12, 3063-3068

Negrutiu I, Shillito RD, Potrykus I, Biasini G, Sala F (1987) Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. Pl. Mol. Biol. 8, 363-373

Neskovic M, Vujicic R, Serjovic V (1985) Differential responses of buckwheat leaf cells to growth substances stimulating cell division. Ann. Bot. 56, 755-760

Ni M, Cui D, Gelvin SB (1994) Wound inducibility and tissue specificity of chimaeric promoters derived from the mannopine and octopine synthase genes. 4th international congress of Plant Molecular Biology. Amsterdam, June 19-24

Nishimura M, Beevers H (1979) Hydrolysis of protein in vacuoles isolated from higher plant tissue. Nature 277, 412-413

Oard JH, Paige DF, Simmonds JA, Gradziel TM (1990) Transient gene expression of maize, rice and wheat cells using an aigrum apparatus. Plant. Physiol. 92, 334-339

Odell JT, Nagy F, Chua N-H (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature 313, 810-812

Ooms G, Kalpwijk PM, Poulis JA, Schilperoort RA (1980) Characterization of Tn904 insertions in octopine Ti plasmid mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 144, 82-91

Otten L, De Greve H, Hernalsteens JP, Van Montagu M, Schneider O, Straub J, Schell J (1981) Mendelian transmission of genes introduced into plants by the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of T-region. Plasmid 7, 15-29

Otten L, Piotrowiak G, Dubois M, Szegedi E, Schell J (1985) Identification of an *Agrobacterium tumefaciens* pTiB6S3 vir region fragment that enhances the virulence of pTiC58. Mol. Gen. Genet. 199, 189-193

Ow D W, Jacobs J D, Howell SH (1986) Functional regions of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter determined by use of the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity. *Proc. Acad. Sci. USA* . 84, 4870-22.

Palmegren G, Mattson O, Thyge Okkels F (1993) Treatment of *Agrobacterium* or leaf disks with 5-azacytidine increases transgene expression in tobacco. *Pl. Mol. Biol.* 21, 429-435

Palms B, Rambour S, De Rycke R, Van Montagu M (1989) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of chicory root explants. The impact of biotechnology in agriculture, international Conference; Université de Picardie. Amiens (France)

Paszkowski J, Shillito RD, Saul MW, Mandák V, Hohn T, Hohn B, Potrykus I (1984) Direct gene transfer to plants *EMBO J.* 3, 2717-2722

Pawlicki N, Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS (1992) Factors influencing the *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Tissue & organ Cult.* 31, 129-139

Pazour GJ, Das A (1990) Characterisation of the vir G binding site of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucl. Acids Res.* 18, 6909-6913

Peach C, Velten J (1991) Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Pl. Mol. Biol.* 17, 49-60

Pécaut P (1958) Note sur la biologie florale de l'endive (*Cichorium intybus* L.) Autocompatibilité et intercompatibilité. XV^{ème} intern. Hort. Congr. 376-380

Petit A, Tempe J (1985) The fonction of T-DNA in nature, p. 625-636. *In* L. van Volten-Doting, G. Groot, and T. Hall (ed.), *Molecular form and function of the plant genome*. Plenum publishing Corp. New York.

Phillips RL, Kaeppler SM, Peschke VM (1990) Do we understand somoclonal variation?. *In* Nijkamp HJJ, van der Plas LHW, van Aartwijk J (eds) *Progress in plant cellular and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 131-141

Pietrazak M, Shillito RD, Hohn T, Potrykus I (1986) Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. *Nucl. Acids. Res.* 14, 5857-5868.

- Potrykus I, Paszkowski J, Saul MW, Petruska J, Shillito RD (1985) Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer. *Mol. Gen. Genet.* 199, 169-177
- Potrykus I (1990) Gene transfer to cereals: An assessment. *Bio/Techn.* 8, 535-542
- Poulsen C, Fluhr M, Kauffman JM, Boutry M, Chua N-H (1986) Characterization of a *rbcS* gene from *Nicotiana plumbaginifolia* and expression of an *rbcS*-Cat chimeric gene in homologous and heterologous nuclear background. *Mol. Gen. Genet.* 205, 193-200
- Powell BS, Kado CI (1990) Specific binding of VirG to the *vir* box requires a C-terminal domain and exhibits a minimum concentration threshold. *Mol. Microbiol.* 4, 2159-2166
- Rambaud C, Dubois J, Vasseur J (1990) Some factors related to protoplast culture and plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of Magdeburg chicory (*Cichorium intybus* var. Magdeburg). *Agronomie* 10, 767-772
- Regensburg AJG, Hooykaas PJJ (1993) Transgenic *N. glauca* plants expressing bacterial virulence gene *vir F* are converted into hosts for nopaline strains of *A. tumefaciens*. *Nature* 363, 69-70
- Reich TJ, Iyer VN, Miki BL (1988) Efficient transformation of alfalfa protoplasts by the intranuclear microinjection of Ti plasmids. *Bo/techn.* 4, 1001-1004.
- Regier DA, Akiyoshi DE, Gordon MP (1985) Nucleotide sequence of *tzs* gene from *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. *Nucl. Acids Res.* 17, 8885-8901
- Reiss B, Sprengel R, Will H, Schaller H. (1984) A new sensitive method for qualitative and quantitative assay of neomycin phosphotransferase in crude cell extracts. *Gene* 30, 211-218.
- Renckens S, De Greve H, Van Montagu M, Hernalstens J-P (1992) *Petunia* plants escape from negative selection against a transgene by silencing the foreign DNA via methylation. *Mol. Gen. Genet.* 233, 53-64
- Rochester D E, Winer J A, Shah D M (1986) The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein. *EMBO J.* 5, 451-458
- Rhodes CA, Pierce DA, Mettler IJ, Mascarenhas D, Detma JJ (1988) Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science* 240, 204-207

- Rogowsky PM, Close TJ, Chimera JA, Shaw JJ, Kado CI (1987) Regulation of the *vir* genes of *Agrobacterium tumefaciens* virulence plasmid pTiC58. J. Bacteriol. 169, 5101-5112
- Ross P, Mayer R, Benziman M (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. Microbiol. Rev. 55, 35-58
- Saito KM, Yamazaki H, Kaneko I, Murakoshi I, Murakoshi Y, Fukuda I, Van Montagu M (1991) Tissu-specific and stress-enhancing expression of the TR promoter for mannopine synthase in transgenic medicinal plants. Planta. 184, 40-46
- Sanders LC, Wang CS, Walling LL, Lord EM (1991) A homolog of the substrate adhesion molecule vitronectin occurs in four species of flowering plants. The Plant Cell 3, 629-635
- Sanger M, Daubert S, Goodman RM (1990) Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus: comparaison with the analogous 35S promoter from cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter. Pl. Mol. Biol. 14, 433-443
- Sangwan RS, Bourgeois Y, Sangwan-Norreel B (1991) Genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* embryos and identification of critical parameters influencing transformation efficiency. Mol. Gen. Genet. 230, 475-485
- Sangwan RS, Bourgeois Y, Brown S, Vasseur G, Sangwan-Norreel B (1992) Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. Planta 188, 439-456
- Sangwan RS, Ducrocq C, Sangwan-Norreel B (1993) *Agrobacterium*-mediated transformation of pollen embryos in *Datura innoxia* and *Nicotiana tabacum* : production of transgenic haploid and fertile homozygous dihaploid plants. Plant Sci. 95, 99-115
- Santi D, Garrett CE, Barr PJ (1983) On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs. Cell 33, 9-10
- Saski N, Dubois J, Millecamps J, Vasseur J (1986) Régénération de plantes de chicorées Witloof cv. "Zoom" à partir de protoplastes: influence de la nutrition glucidique et azotée. C. R. Acad. Sci. Hort. Sci. Paris 302, 165-170
- Schlappi, Hohn B (1992) Competence maïze embryos for *Agrobacterium*-mediated gene transfer. Plant Cell 4, 7-16

Schell J, Konz C, Spena A, Palme K, Walden R (1993) Genes involved in the control of growth and differentiation in plants. *Gene* 135, 245-249

Schmidt R, Willimitzer L (1988) High efficiency *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants. *Plant Cell Reports*. 7, 583-586.

Schmidt R, Willimitzer L (1989) The maize autonomous element *Activator* (*Ac*) shows a minimal germinal excision frequency of 0.2% - 0.5% in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *Mol. Gen. Genet.* 220, 17-24

Schmulling T, Schell J, Spena A (1988) Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *EMBO J.* 7, 2621-2629

Schrammeijer B, Sijmons PC, van den Elzen PJM, Hoekema A (1990) Meristem transformation of sunflower *via Agrobacterium*. *Plant Cell Rep.* 9, 55-60

Senaratna T, McKersie BD, Kasha KJ, Procunier JD (1991) Direct DNA uptake during the imbibition of dry cells *Plant Sci.* 79, 223-228

Sene A, Vasseur J, Lefebvre J (1983) : Sur l'aptitude de petits explantats racinaires de *Cichorium intybus* L. (var; Witloof) à produire les racines adventives en culture in vitro. *C.R. Acad. Sci. (III)* 297, 81-86

Sengupta-Gopalan C, Reichert NA, Barker RF, Hall TC, Kemp JC (1985) Developmentally regulated expression of phaseolin a bean protein in tobacco seed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 3320-3324

Shillito RD, Saul MW, Paszkowski J, Müller M, Potrykus I (1985) High efficiency direct gene transfer to plants. *Bio/Techn* 3, 1099-1103

Shimamoto k, Terada R, Izawa T, Fujimoto H (1989) Fertie transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts *Nature* 338, 247-276

Shimoda N, Toyoda-Yamamoto A, Nagamine J, Usami S, Katayama M, Sakagami Y, Mashida Y (1990) Control of expression of *Agrobacterium tumefaciens* vir genes by synergetic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 6684-6688

Shirasu K, Morel P, Kado CI (1990) Characterization of the *vir B* operon of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid: nucleotide sequence and protein analysis. *Mol. Microbiol.* 4, 1153-1163

Shirley BW, Berry-Lowe SL, Rogers SC, Flick JS, Horsch R, Fraley RT, Meagher RB (1987) 5' proximal sequences of a soybean ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit gene direct light and phytochrome controlled transcription. *Nucl. Acids Res.* 15, 6501-6514

Shirsat AH, Wilford N, Croy RRd (1986) Gene copy number and levels of expression in transgenic plants of a seed specific promoter. *Plant Sci.* 61, 75-80

Simoens C, Alliotte TH, Mendel R, Muller A, Schiemann J, Van Lijsebettens M, Schell J, Van Montagu M, Inze D (1986) A binary vector for transferring genomic libraries to plants. *Nucl. Acids Res.* 14, 8073-8090

Simpson RB, O'hara PJ, Kwok W, Montoya AL, Licktenstein C, Gordon MP, Nester EW (1982) DNA from the A6S/2 crown gall tumor contains scrambled Ti plasmid sequences near its junctions with the plant DNA. *Cell* 29, 1005-1014

Simpson J, Schell J, Van Montagu M, Herrera-Estrella L (1986) Light inducible and tissue specific pea *Ihpc* gene expression involves an upstream elements combining enhancer- and silencer- like properties. *Nature (London)* 323, 551-5547

Smit G, Swart S, Lugtenberg BJJ, Kijne JW (1992) Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol. Microbiol.* 6, 2897-2903

Sonti RV, Chiurazzi M, Harlow WGR, Davies C, Mount D, Signer E (1994) *Arabidopsis* mutants deficient in T-DNA integration. 4th international congress of Pl. Mol. Biol. Amsterdam, June 19-24

Southern E (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.

Spangenberg G, Koop HU, Lichter R, Schweiger HG (1986) Microculture of single protoplasts of *Brassica napus*. *Physiol Plant.* 66, 186-195

Spanier K, Schell J, Schreier PH (1989) A functional analysis of T-DNA gene 6B: the fine tuning of cytokinin effects on shoot development. *Mol. Gen. Genet.* 219, 209-216

- Spena A, Scmulling T, Koncz C, J Schell (1987) Independent and synergistic activity of *rolA*, B and C loci in stimulating abnormal growth in plants. EMBO J. 6, 3891-3899
- Spielmann A, Simpson RB (1986) T-DNA structure in transgenic tobacco plants with multiple independent integration sites. Mol. Gen. Genet. 205, 34-41.
- Stachel SE, Messens E, Van Montagu M, Zambryski P (1985) Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. Nature 318, 624-629
- Stachel SE, Nester EW (1986) The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. EMBO J. 5, 1445-1454
- Stachel SE, Nester EW, Zambryski P (1986) A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 379-383
- Stachel SE, Timmerman B, Zambryski P (1987) Activation of *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression generates multiple single-strand molecules from the pTiA6 region: requirement for 5' *vir* D products. EMBO.J.6, 857-863
- Stachel SE, Zambryski P (1986) *vir* A and *vir* G control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *Agrobacterium tumefaciens*. Cell 46, 325-333
- Stanchez-Serrano J, Schmidt R, Schell J, Willmitzer L (1986) Nucleotide sequence of proteinase inhibitor II encoding DNA of potato (*Solanum tuberosum*) and its mode of expression. Mol. Gen. Genet. 203, 15.
- Stefanov I, Fekete S, Bögre L, pauc J, Feher A, Dudits D (1994) Differential activity of the mannopine synthase and the CaMV 35S promoters during development of transgenic rapessed plants. 95, 175-186
- Stoeber F (1961) Etudes des propriétés et de la biosynthèse de la glucuronidase et de la glucuronide-pérméase chez *E. coli*. Thèse de Docteur és Science, Univercity of Paris, Paris France
- Strittmatter and Chua N-H (1987) Artificial combination of two cis-regulatory elements generates a unique pattern of expression in transgenic plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 8986-8990

- Sun LY, Touraud G, Charbonnier C, Tepfer D (1991) Modification of phenotype in belgian endive (*Cichorium intybus*) through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*: conversion from biennial to annual flowering. *Transgenic Res.* 1, 14-22
- Suzuki S, Oldberg A, Hayman EG, Pierschbacher MD, Ruoslahti E (1985) Complete amino acid sequence of human vitronectin deduced from cDNA. Similarity of cell attachment sites in vitronectin and fibronectin *EMBO J.* 4, 2519- 2524
- Swart S, Smit G, Lugtenberg BJJ, Kijne JW (1993) Restoration of attachment, virulence and nodulation of *Agrobacterium tumefaciens* chvB mutants by rhicadhesin. *Mol. Microbiol.* 10(3), 597-605
- Tatsuka M, Mitsui H, Wada M, Nagata A, Nojima H, Okayama H (1992) Elongation factor-1a gene determines susceptibility to transformation. *Nature* 359, 333-336
- Tavazza R, Tavazza M, Ordas RJ, Ancora G, Benvenuto E (1988) Genetic transformation of potato (*Solanum tuberosum*): an efficient method to obtain transgenic plants. *Plant Sci.* 59, 175-181
- Taylor MG, Vasil IK (1991) Histology and physical factors affecting transient GUS expression in pearl millet (*pennisetum glaucum* L.) R. Br. embryos following microprojectile bombardement. *Plant Cell Rep.* 10, 120-125
- Teeri TH, Lehvaslaiho H, Franck M, Uotila J, Heino P, Palva ET, Van Montagu M, Herrera-Estrella L (1989) Gene fusions to lac Z reveal new expression patterns of chimeric genes in transgenic plants. *EMBO J.* 8, 343-350
- Terada R, Shimamoto K (1990) Expression of a CaMV35S-GUS gene in transgenic rice plants. *Plant Cell Rep.* 220, 389-392
- Thomashow MF, Karlinsey JE, Marks JR, Hurlbert RE (1987) Identification of a new virulence locus in *Agrobacterium tumefaciens* that affects polysaccharide composition and plant cell attachment. *J. Bacteriol.* 169, 3209-3216
- Thomashow MF, nutter R, montoya AL, Gordon MP, nester EW (1980) Integration and organisation of Ti plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell* 19, 729-739

- Thornburg RW, An G, Cleveland TE, Johnson R, Ryan CA (1987) Wound-inducible expression of a potato inhibitor II-Chloramphenicol acetyl transferase gene fusion in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 744.
- Tinland B, Huss B, Paulus F, Bonnard G, Otten L (1989) *Agrobacterium tumefaciens* 6b genes are strain-specific and affect the activity of auxin as well as cytokinin genes. *Mol. Gen. Genet.* 219, 217-224
- Tomes D, Weissinger AR, Russ M, Higgins R, Drimond BJ, Schaf S, Malone-Schoneberg J, Staebell M, Flynn P, Anderson J, Howard J (1990) Transgenic tobacco plants and their progeny by microprojectile bombardment of tobacco leaves. *Pl. Mol. Biol.* 14, 261-268
- Toponi M. (1963) Sur la culture de fragments de feuilles d'endive (*Cichorium intybus* L.) . *CR. Acad. Sci. Paris.* 257, 3212-3215
- Toriyama K, Arimoto Y, Uchimiya H, Hinata K (1988) Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *Bio/Techn.* 6, 1072-1074.
- Toro N, Datta A, Carmi OA, Young C, Prusti RK, Nester EW (1989) The *Agrobacterium tumefaciens virC1* gene product binds to overdrive, a T-DNA transfer enhancer. *J. Bacteriol.* 171, 6845-6849
- Toyoda H, Malsuda Y, Utsumi R, Ouchi S (1988) Intranuclear microinjection for transformation of tomato callus cells. *Plant Cell Rep.* 7, 292-296
- Twiss D, Klein TM, Fromm ME, McCormick S (1989) Transient expression of chimeric genes delivered into pollen by microprojectile bombardment. *Plant Physiol.* 91, 1270-1274
- Twiss D, Ooms G (1987) The 5' flanking DNA of a patatin gene directs tuber specific expression of a chimeric gene in potato. *Pl. Mol. Biol.* 9, 365-375
- Twiss D, Yamaguchi J, Wing RA, Ushiba J, McCormick S (1991) Promoter analysis of genes that are coordinately expressed during pollen development reveals pollen specific enhancer sequences and shared regulatory elements. *Genes Dev.* 5, 496-507
- Twiss D (1992) Use of nuclear-target β -glucuronidase fusion protein to demonstrate vegetative cell-specific gene expression in developing pollen; *The Plant J.* 2(6), 887-892

- Ursic D, Slightom JL, Kemp JD (1983) *A tumefaciens* T-DNA integrates into multiple sites of the sunflower crown gall genome Mol. Gen. Genet. 190, 494-503
- Van der Steege G, Nieboer M, Swaving J, Tempelaar MJ (1992) Potato granule-bound starch synthase promoter-controlled GUS expression: regulation of expression after transient and stable transformation. Pl. Mol. Biol. 20, 19-30
- Van Larebeke N, Hernalsteens JP, Depicker A, Zaenen I, Messens E, Van Montagu M, Schell, J (1977) Transfer of Ti-plasmids between *Agrobacterium* strains by mobilization with the conjugative plasmid RP4. Mol. Gen. Genet. 152, 119-124
- Van Lijsbettens M, Inze D, Schell J, Van Montagu. M (1986) Transformed cell clones as a tool to study T-DNA integration mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. J. Mol. Biol. 188, 129-145
- van Wordragen MF, Dons HJM (1992) *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated transformation of recalcitrant crops. Pl. Mol. Biol. Rept. 10(1), 12-35
- Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M (1990) Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Mol. Gen. Genet. 220, 245-250
- Vasil V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK (1992) Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardement of regenerable embryogenic callus. Bio/Techn. 10, 667-674
- Vasseur J (1979) Etude du bourgeonnement de fragments de feuilles étiolées d'endive. II. Formation des bourgeons en fonction des caractéristiques biochimiques. Rev. Gen. Bot. 86, 113-190
- Vasseur J, Lefebvre R, Backoula E (1986) Sur la variabilité de la capacité rhizogène d'explants racinaires de *Cichorium intybus* L. var Witloof cultivés *in vitro* : influence de la dimension des explants initiaux et de la durée de conservation des racines au froid. Can. J. Bot. 64, 243-247
- Veluthambi K, Jayaswal RK, Gelvin SB (1987) Virulence genes A, G and D mediated the double stranded border cleavage of T-DNA from the *Agrobacterium* Ti plasmid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 1881-1885

- Vermeulen A, Vaucheret H, Paulot V, Chupeau Y (1992) *Agrobacterium*-mediated transfer of a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene confers resistance to chlosulfuron in chicory (*Cichorium inthybus* L.). Plant Cell Rep. 11, 243-247
- Vogel AM, Das A (1992) The *Agrobacterium tumefaciens* vir D3 gene is not essential for tumorigenicity on plants. J. Bacteriol. 174 (15), 5161-5164
- Vogel BE, LeeS-J, Hildebrand A, Craig W, Pierschbacher MD, Wong-Stall F, Ruoslahti E (1993) A novel integrin specificity exemplified by binding of the av $\beta 5$ integrin to the basic domain of the HIV Tat protein and vitronectin. J. Cell. Biol. 121, 461-468
- Vuylsteker C, Prinsen E, Galis I, Bouazza A, Van Onckelen H, Rambour S (1992) Poster présenté ai Congrès de la Fédération des Sociétés Européenne de physiologie végétale (FESPP), Anvers
- Wagner VT, Matthyse AG (1992) Involvement of a vitronectin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrots suspension culture cells. J. Bacteriol. 174 (18) 5999-6003
- Wali Alami F (1987) Préparation et culture de protoplastes de *Cichorium intybus* L. var. Witloof: Amélioration des rendements. Thèse Université des sciences et techniques de Lille Flandres Artois.
- Ward ER, Barnes WM (1988) Vir D2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end of T strand DNA. Science 242, 927-930
- Ward JE, Akiyoski DE, Regier D, Datta A, Gordon MP, Nester EW (1988) Characterization of the *vir B* operon from an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. J. Biol. Chem. 263, 5804-5814
- Ward JE, Dale EM, Christie PJ, Nester EW, Binns AN (1990) Complementation analysis of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid *vir B* genes by use of a *vir* promoter expression vector: *vir B9*, *vir B10* and *vir B 11* are essential virulence genes . J. Bacteriol. 172, 5187-5199
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC (1991) Co-ordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired résistance. Plant cell 3, 1085-1094
- Warkentin TD, McHughen A (1992) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated β -glucuronidase (GUS) gene expression in lentil (*Lens culinaris* Medik) tissues. Plant Cell Rep. 11, 274-278

- Weber G, Monajembashi S, Grenlich KO, Wolfrum J (1988) Injection of DNA into plant cells with a UV laser microbeam. *Naturwiss.* 75, 35-36
- Weber H, Ziechmann C, Graessman A (1990) *in vitro* DNA methylation inhibits gene expression in transgenic tobacco. *EMBO J.* 9, 4409-4415
- Weintraub J, Frank D, Razin A, Cedar H (1985) Assembly and propagation of repressed and depressed chromosomal states. *Cell* 42, 705-711
- Weising K, Schell J, Kahl G (1988) Foreign genes in plants: structure expression and applications. *Ann. Rev. Genet.* 22, 421-477
- Whatley MH, Bodwin JS, Lippincott BB, Lippincott JA (1976) Role for *Agrobacterium* cell envelope lipopolysaccharides in infection site attachment. *Infect. Immun.* 13, 1080-1083
- White EF, nester EW (1980) Hairy root: plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriol.* 141, 1134-1141
- Williamson JD, Hirsch-Wyncott ME, Lankins BA, Gelvin SB (1989) Differential accumulation of a transcript driven by the CaMV 35S promoter in transgenic tobacco. *Plant Physiology* 90, 1570-1576
- Willmitzer L , Somons G, Schell J (1982) The T-DNA in octopine crown-gall disease. *Trends Biochem. Sci.* 12, 271-275.
- Willmitzer L, Dhaes P, Schreier P H, Schmalenbach W, Van Montagu M, Schell J (1983) Seize, location and polarity of T-DNA encoded transcripts in nopaline crown-gall tumors ; evidence for common transcripts in nopaline crown-gall present in both octopine and nopaline tumors. *Cell.* 32, 1045-1056.
- Winans SC, Kerstetter RA, Nester EW (1988) Transcriptional regulation of the *vir A* and *vir G* genes of *Agrobacterium tumefaciens* *J. Bacteriol.* 170, 4047-4054
- Winans SC (1990) Transcriptional induction of an *Agrobacterium* regulatory gene at tandem promoters by plant-released phenolic compounds, phosphate starvation and acid growth media. *J. Bacteriol.* 172, 2433-2438
- Winans SC (1992) Two-Way chemical signaling in *Agrobacterium*-Plant Interactions. *Microbiol. Rev.* 56(1) 12-13

- Wyatt SE, Carpita NC (1993) The cytoskeleton-cell-wall continuum. Trends in Cell Biology 3(12), 413-417
- Yadav NS, Vanderlayden J, Bennett DR, Barnes WM, Chilton M-D (1982) Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. Proc. Natl. Acad. Sci USA 79, 6322-6326
- Yang H, Zhang HM, Davey MR, Mulligan MJ, Cocking EC (1988) Production of kanamycin-resistant rice tissues following DNA uptake into protoplasts. Plant Cell Rep. 7, 421-425
- Yang W, Burkhart W, Cavallius J, Merrick WC, Boss WF (1993) Purification and characterization of a phosphatidylinositol 4-kinase activator in carrots cells. J. Biol. Chem. 268, 392-398
- Yanosfsky MF, Porter SG, Young C, Albright A, Gordon MP, Nester EW (1986) The *vir D* operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. Cell 47, 471-477
- Ying M, Dyer WE, Bergman JW (1992) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cv.'Centennial'. Plant Cell Rep. 11, 581-585
- Young C, Nester EW (1988) Association of the *vir D2* protein with 5' end of T strands in *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 170, 3367-374
- Zambryski P (1980) Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. Annu. Rev. Genet. 22, 1-30
- Zambryski P (1988) Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. Annu. Rev. Genet. 22, 1-30
- Zambryski P (1989) *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer p. 309-334. In D.E Berg and M.M. Howe (ed.), Mobile DNA. American Society for Microbiology, Washing, D.C
- Zhang W, Wu R (1988) Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. Theor. Appl. Genet. 76, 835-840
- Zeevart JAD, Greelman Ra (1988) metabolism and physiology of abscisic acid. Ann. Rev. Plant Physiol. 39, 439-473

Zhou X, Fan Y-L (1993) The endosperm-specific expression of rice prolamin chilaeric in transgenic tobacco plants. *Trans. Res.* 2, 141-146

Zhu J-K Shi J, Wyatt SE, Bressan RA, Hasegawa PM, Carpita NC (1993) Enrichment of vitronectin-and fibronectin-like proteins in NaCl-adapted plant cells and evidence for their involvement in plasma membrane-cell wall adhesion. *The Plant J.* 3 (5), 637-646

Zhu J-K, Damsz B, Kononowicz AK, Bressan RA, Hasegawa PM (1994) A higher plant extracellular vitronectin-like adhesion protein is related to the translational elongation factor-1 α . *The Plant Cell.* 6, 393-404

Zhu J-K, Shi J, Carpita NC (1991) Possible involvement of vitronectin- and fibronectin-like proteins in membrane-wall and protoplast adhesion in salt-adapted tobacco cells. *Plant Physiol.* 96 (suppl):10 .

Zhu Z, Hugues KW, Huang L (1991) Effects of 5-azacytidine on transformation and gene expression in *Nicotiana tabacum* . *In vitro Cell. Dev. Biol.* 27, 77-83

Zimmermann U (1982) High frequenct fusion of plant protoplast by electric fields. *Planta* 151, 26-32

Résumé

Des essais de transformation génétique de la chicorée de Bruxelles cv. Flash par *Agrobacterium tumefaciens* contenant les gènes *uidA* et *nptII* ont été tentés sur trois types d'organes : racines tubérisées, feuilles et cotylédons.

Dans une première construction, les gènes introduits étaient sous le contrôle du promoteur double TR 1'2' de la mannopine synthase. Dans une autre construction, les promoteurs étaient le 35S CaMV et le nos.

Les explants racinaires produisent des bourgeons dont l'activité GUS est transitoire. Nous avons donc abandonné ce type de matériel. Les feuilles et les cotylédons produisent des transformants présentant une activité GUS stable, mais la fréquence de transformation est plus élevée avec les cotylédons. une étape de préculture des feuilles améliore, cependant, les rendements de transformation.

Les analyses biochimiques des plantes transgéniques montrent une expression du gène *nptII* chez ces plantes ainsi qu'une intégration des gènes de l'ADN-T dans leurs génomes.

La présence de vitronectine et de fibronectine a récemment été mise en évidence dans la matrice extracellulaire de cellules végétales et pour certains auteurs la vitronectine constituerait un site de liaison des agrobactéries.

Nous avons mis en évidence la présence de protéine de type vitronectine dans les explants cotylédonaires et foliaires, mais non dans les racines. une étape de préculture des feuilles n'augmente pas la production de ce type de protéine. Nous ne pouvons donc pas conclure à un rôle de la vitronectine dans la transformation génétique de la chicorée par les agrobactéries utilisées.

La transmission de la résistance à la kanamycine suit les fréquences mendéliennes dans 57% des cas. Dans le reste, les fréquences calculées suggèrent que le gène *uidA* est transmis comme un caractère létal. Ainsi, les analyses moléculaires des plantes de la génération F1 et l'étude du mode de transmission des transgènes dans la génération F2 sont nécessaires pour montrer si l'insertion de l'ADN-T se maintient au fil des générations suivantes.

Parallèlement à la transformation indirect par les souches d'*Agrobacterium tumefaciens*, nous avons utilisé l'étude d'une transformation directe par électroporation de protoplastes de chicorée. les rendements restent faibles et la méthode demande à être optimisée.

Mots clef : Chicorée, *Agrobacterium tumefaciens*, électroporation, ADN-T, TR 1'2', 35S CaMV, nos, activité GUS, résistance à la Kanamycine.

Summary

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation assays on witloof chicory (*Cichorium intybus* L. var. Witloof cv. Flash) were realized using three types of plant organs: tap-roots, leaves and cotyledones.

Agrobacterium strains contained two selectable markers (*uidA* and *nptII*) used in two different constructs; one where the two markers were under control of the double TR1'2' mannopine synthase promoter and the other one where they were under control of the 35SCaMV and *nos* promoter.

Tap-root explants produced shoots having transitory GUS expression. We thus abandoned this kind of material. Leaves and cotyledones produced transformants bearing more stable GUS activities where cotyledons produced the highest number of transformants. But a preculture improved the rate of leaf-transformations.

Biochemical and molecular analysis of the transgenic plants revealed besides the *nptII*-gene expression, the T-DNA integration into their genomes.

Vitronectine and fibronectine have recently been detected in the extracellular matrix of plant cells where, according to several authors, they might intervene in the binding sites for *Agrobacteria*. We have shown the presence of those kind of proteins in cotyledonary and leaf explants, but not in the roots. The preculture did not affect the production of the vitronectine. Thus we can not conclude for the possible role of the vitronectins in the genetic transformation of chicory.

In 57 % of the regenerants resistance to kanamycin and hygromycin were inherited in a Mendelian fashion. Concerning the other 43 %, the calculated frequencies made us suppose that the *uidA* gene was transmitted as a lethal gene. Therefore molecular analysis of the F1 generation and a study of the transgene transmission to the F2 generation is necessary in order to see whether the T-DNA insertion is stable during the following generations.

In a similar way, we also studied the possibility of direct-gene transfer by means of electroporation of chicory protoplasts, but as the yield was rather low the procedure needs to be optimized.

Key-words: Chicory - *Agrobacterium tumefaciens* - electroporation - T-DNA - TR1'2' - 35SCaMV - *nos* - GUS - NPTII

