

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

BADJI MOKHTAR-ANNABA UNIVERSITY  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA



جامعة باجي مختار - عنابة

Faculté des Sciences

Année : 2004

Département de Biochimie

## THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de **DOCTORAT**

**Contribution à l'étude des fonctions déterminées par l'ORF8  
du T-DNA du plasmide Ri2659 d'*Agrobacterium rhizogenes***

**Option  
Biologie Moléculaire**

**Par  
Akila OUARTSI**

DIRECTEURS de THESE :

Boudjema SAMRAOUI  
Yves DESSAUX

Professeur  
Directeur de Recherche

Université Annaba  
CNRS Gif/Yvette

### DEVANT LE JURY

PRESIDENT :

Louhichi BRINIS

Professeur

Université Annaba

EXAMINATEURS :

F-Zohra FYAD  
Dalila SATTA

Maître de conférences  
Maître de conférences

Université Oran  
Université Constantine



## ABSTRACT

*Agrobacterium rhizogenes* is a rhizospheric bacteria and the causative agent of the hairy root disease that affects several dicotyledonous plants. Of the three well-known strains of *A. rhizogenes* (A4, 8196 and 2659), the most studied one has been A4. Most of the data have been generated about its pathogenic plasmid (pRiA4) and its gene functions. The less studied plasmids, pRi8196 and pRi2659, show some differences in terms of genetic organization as compared to pRiA4. The T-DNA genes *rolA*, *rolB*, and *rolC* (ORFs 10, 11 and 12) appear to suffice to induce root formation in most assayed plant species. However, the most conserved sequences of all known *A. rhizogenes* T-DNAs are ORF 8, 13 and 14. In this work, we investigate the conserved gene ORF8 of pRi2659. Sequence comparisons suggest that the gene product of ORF8 is involved in mediating auxin-related effects for it has low but significant similarities to: (i) the Tms1 protein encoded by *tms1* gene of the *A. tumefaciens* T-DNA, responsible for the synthesis of indole-3-acetamide (IAM), a precursor of auxin; (ii) the *A. rhizogenes rolB* product; and (iii) the putative protein encoded by *A. tumefaciens* T-DNA gene 5 which converts tryptophan to indole-3-lactic acid (ILA), an analogue of auxin. We analyzed hormone responses of transgenic tobacco plants and tissues expressing the ORF8 of pRi2659 under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter (35S-ORF8). We found that transgenic seedlings expressing 35S-ORF8 were resistant to auxin concentrations that inhibited germination and growth of wild-type seedlings. Furthermore, the auxin-induced rooting response of transgenic leaf discs was decreased. Cotyledons of transgenic seedlings exhibited a thin and lanceolated shape. Transgenic cotyledons and leaves accumulated high amounts of starch, but adult tobacco plants expressing ORF8 were not affected in their growth pattern and morphology. A fusion of the ORF8 promoter with *uidA*, encoding  $\beta$ -glucuronidase (GUS), revealed that ORF8 transcription is auxin-induced. Moreover, pRi2659 ORF8 promoter sequences harbor motifs corresponding to auxin-regulated genes from plants, and feature a RAV1 (a DNA-binding protein) binding sequence that is present in other promoter regions of genes encoding proteins that bind to auxin. The putative protein encoded by ORF8 of pRi2659 has a FAD binding site within its C terminal domain, characteristic of tryptophan-2-monooxygenase proteins (T2M).

**Key words** : pRi2659, ORF8, germination, cotyledon, *Nicotiana tabacum*, auxin.

## RESUME

*Agrobacterium rhizogenes*, bactérie de la rhizosphère est l'agent causal du hairy root qui affecte de nombreuses plantes dicotylédones. Des trois souches les mieux connues d'*A. rhizogenes* (A4, 8196 et 2659), la plus étudiée est la souche A4. La plupart des données proviennent de l'étude de son plasmide pathogène pRiA4 et de ses fonctions. Les plasmides les moins étudiés, pRi8196 et pRi2659, montrent certaines différences quant à leur organisation génétique comparés à pRiA4. Chez la plupart des espèces de plantes testées les gènes *rolA*, *rolB*, *rolC* (ORF10, 11 12) du T-DNA des différents plasmides Ri sont suffisants pour induire la prolifération de racines. Cependant, les séquences les mieux conservées ne sont pas les gènes *rol* mais les ORFs 8, 13 et 14. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au gène ORF8 de pRi2659. L'étude des comparaisons de séquences suggère que le produit du gène ORF8 pourrait être impliqué dans des effets liés à l'auxine car il présente certaines similitudes significatives avec : (i) la protéine Tms1 codée par le gène *tms1* du T-DNA d'*A. tumefaciens*, responsable de la synthèse de l'indole-3-acétamide (IAM), un précurseur de l'auxine; (ii) le produit du gène *rolB* d'*A. rhizogenes* ; et (iii) la protéine prédite codée par le gène 5 du T-DNA d'*A. tumefaciens* qui convertit le tryptophane en acide indole-3-lactique (AIL), un analogue de l'auxine. Nous avons analysé les réponses aux hormones des plantes et tissus de tabac transgéniques exprimant l'ORF8 de pRi2659 sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV). Nous avons trouvé que les plantules exprimant le 35S-ORF8 sont résistantes à des concentrations d'auxine qui inhibent la germination et la croissance des plantules sauvages. De plus, la réponse de l'induction racinaire par l'auxine de disques foliaires transgéniques était plus faible comparée à celle du contrôle. Les cotylédons des plantules transgéniques montrent une forme étroite et lancéolée. En outre, les cotylédons et les feuilles transgéniques accumulent d'importantes quantités d'amidon, mais les plantes de tabac adultes exprimant l'ORF8 ne sont affectées ni dans leur croissance ni dans leur morphologie. La fusion du promoteur de l'ORF8 avec le gène *uidA*, codant la  $\beta$ -glucuronidase (GUS), révèle que la transcription de l'ORF8 est induite par l'auxine. Les séquences du promoteur de l'ORF8 de pRi2659 possèdent des motifs correspondants aux gènes de plantes régulés par l'auxine et se distinguent par la présence d'une séquence reconnue par RAV1 (protéine fixant l'ADN), séquence retrouvée dans certaines régions promotrices de gènes codant des protéines qui fixent l'auxine. La protéine putative ORF8 de pRi2659 possède dans son domaine C-terminal un site de fixation du FAD, caractéristique des tryptophane-2 monooxygénases (T2M).

**Mots-clefs** : pRi2659, ORF8, germination, cotylédon, *Nicotiana tabacum*, auxine.

## TABLEAUX

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<u>Tableau 1</u>	Quelques caractères distinctifs des différents biotypes.	9
<u>Tableau 2</u>	Fonctions des principaux gènes de virulence du plasmide Ti à octopine.	13
<u>Tableau 3</u>	Les gènes de synthèse d'opines.	15
<u>Tableau 4</u>	Comparaison des similitudes entre le transfert du T-DNA et le transfert conjugatif du plasmide RP4.	22
<u>Tableau 5</u>	Système de sécrétion de type IV d' <i>A. tumefaciens</i> et les protéines homologues des plasmides conjugatifs RP4, F et R388 et du système de transfert d' <i>H. pylori</i> et de <i>B. pertussis</i> .	25
<u>Tableau 6</u>	Composition des opines.	30
<u>Tableau 7</u>	Classification des plasmides Ti et Ri.	32
<u>Tableau 8</u>	Phénotypes des plantes transgéniques obtenues par introduction de gènes <i>rol</i> et des autres gènes sous le contrôle de leur propre promoteur ou sous le contrôle du promoteur 35S.	40
<u>Tableau 9</u>	Expression tissus et organes spécifiques des oncogènes et autres gènes du T-DNA des plasmides Ri.	48
<u>Tableau 10</u>	Rôles proposés pour les oncogènes du T-DNA des plasmides Ri.	50
<u>Tableau 11</u>	Taille et produits des gènes <i>rol</i> A, B, C et des ORFs 13 et 8 des différents plasmides Ri.	53
<u>Tableau 12</u>	Caractéristiques des souches.	55
<u>Tableau 13</u>	Caractéristiques des plasmides.	56
<u>Tableau 14</u>	Valeurs des longueurs (L) et largeurs (l) des cotylédons de plantes sauvages (WT) et transgéniques (pro-ORF8 et 35S-ORF8).	72
<u>Tableau 15</u>	Pourcentage de graines issues d'autres lignées transgéniques (pro8-ORF8 ; 35S-ORF8) ayant germées sur milieu MS additionné de 10 et 20 $\mu$ M de NAA.	78
<u>Tableau 16</u>	Activité GUS au niveau des feuilles et des racines de 9 plantes de tabac transgéniques pro8-GUS.	81
<u>Tableau 17</u>	Activité Gus au niveau des feuilles de plantes pro8-GUS en présence de NAA et de 6 BAP à une concentration de 10 $\mu$ M après 24heures d'incubation.	84
<u>Tableau 18</u>	Homologies de pORF8 de pRi2659 avec Tms1, RolB et le produit du gène 5.	86
<u>Tableau 19</u>	Nombre d'éléments de séquences d'ADN communs aux promoteurs des ORFs 8, de <i>rol</i> B et du gène 5.	92

## FIGURES

<b><u>Figures</u></b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<u>Figure 1</u>	A- tumeurs de crown gall sur tige de pomme de terre ; B- hairy root sur une tige de kalanchoe.	4
<u>Figure 2</u>	Racines de pois transformées par <i>A. rhizogenes</i> , cultivées sur milieu MS pendant 2 semaines.	7
<u>Figure 3</u>	Plantes de tabac : normale (N) et transformée (T) par <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	7
<u>Figure 4</u>	Organisation fonctionnelle du plasmide pTiC58 d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	11
<u>Figure 5</u>	Carte génétique du plasmide pRi1724.	12
<u>Figure 6</u>	Organisation structurale de l'opéron du catabolisme de l'agrocinopine ( <i>acc</i> ).	15
<u>Figure 7</u>	Comparaison de l'organisation génétique des plasmides des <i>Rhizobiaceae</i> .	17
<u>Figure 8</u>	Principales étapes de l'interaction <i>Agrobacterium</i> -cellule végétale.	20
<u>Figure 9</u>	Modèle d'intégration du T-DNA dans le génome végétal.	29
<u>Figure 10</u>	Structure chimique de quelques opines.	31
<u>Figure11</u>	Voie de biosynthèse de l'acide indole-3- acétique dans les cellules végétales transformées par <i>A. tumefaciens</i> ou <i>A. rhizogenes</i> .	35
<u>Figure 12</u>	Carte fonctionnelle du T-DNA du pTiC58 à nopaline et du pTiAch5 à octopine.	37
<u>Figure 13</u>	Organisation fonctionnelle du T-DNA de pRiA4 à agropine et de pRi2659 à cucumopine et de pRi8196 à mannopine.	39
<u>Figure 14</u>	Cartes d'homologie de 3 T-DNA des plasmides 2659, 8196 et 1855, pris deux à deux.	52
<u>Figure15</u>	Schéma de la construction des plasmides pJBORF8 et pJBK3.	58
<u>Figure 16</u>	Schéma des différentes étapes de clonage de pJB35S-ORF8.	60
<u>Figure 17</u>	Schéma de la construction du plasmide pJB8-GUS.	61
<u>Figure 18</u>	Analyse des produits de PCR obtenus après amplification de l'ORF8 chez les plantes transgéniques de <i>Nicotiana tabacum</i> L.cv xanthi.	70
<u>Figure 19</u>	Analyse des transcrits par la réverse transcriptase PCR (RT- PCR) des plantes transgéniques de <i>N. tabacum</i> L.cv xanthi.	71
<u>Figure 20</u>	Phénotype des cotylédons de tabac transgénique et sauvage.	73
<u>Figure 21</u>	Ultrastructure des cellules de cotylédons de tabac transgéniques 35S-ORF8 et de tabac sauvages	75

<u>Figure 22</u>	Germination des graines de tabac transgénique et sauvage en présence d'auxine.	77
<u>Figure 23</u>	Nombre de racines par disques foliaire de plantes transgéniques 35S-ORF8 et de plantes de tabac sauvages en présence de différentes concentrations de NAA après la première et la troisième semaine.	78
<u>Figure 24</u>	Profils des dérivés métaboliques du NAA ( $H^3$ ) chez les plantules de tabac 35S-ORF8 (A) et les plantules non transformées (B).	80
<u>Figure 25</u>	Effets de la concentration d'auxine (NAA) sur l'activité GUS de plantes tabac transgéniques pro8-GUS.	82
<u>Figure 26</u>	Mesure de l'activité GUS de feuilles de tabac transgéniques pro8-GUS en fonction du temps.	83
<u>Figure 27</u>	Comparaison graphique des séquences protéiques entre le peptide ORF8 de pRi2659 (séquence horizontale) et le peptide RolB de pRi2659 (séquence verticale).	88
<u>Figure 28</u>	Alignement des domaines C-terminaux des séquences peptidiques de l'ORF8 de pRi2659 et de la protéine Tms1 de pTiAch5.	90

## ABREVIATIONS

AIA	acide indole-3- acétique
BAP	6-benzylaminopurine
GUS	$\beta$ -glucuronidase
IAM	indole-3-acétamide
kb	kilobase (1000 bases)
MU	4-méthyl umbelliférone
MUG	4-méthyl umbelliferyl glucuronide
MS20	milieu de Murashige et Skoog (1962) contenant 20g/l de saccharose.
NAA	« naphthaleneacetic acid », $\alpha$ -acide naphtalène acétique.
ORF	«open reading frame », cadre de lecture ouvert.
pb	paire de base
PCR	« polymerase chain reaction », amplification par polymérisation d'ADN.
pRi	« root inducing plasmid », plasmide pathogène d' <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .
pTi	« tumor inducing plasmid », plasmide pathogène d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
<i>rol</i>	« rooting locus », famille de gènes localisés sur le T-DNA des souches d'A. <i>Rhizogenes</i> et impliqués dans le syndrome du hairy root.
35S	promoteur de l'ARN 35S du « Cauliflower Mosaic Virus » (CaMV), virus de la mosaïque du chou fleur.
T-DNA	«Tranferred DNA », fragment d'ADN des plasmides Ri/Ti transféré aux cellules végétales.
T2M	Tryptophane-2-monooxygénase
RAV1	<u>Reliée à <u>AB13/VP1</u></u>

# TABLE DES MATIERES

<b>Chapitre I - INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>2</b>
Introduction	2
1- La maladie	3
1.1. La galle du collet ou « crown gall »	3
1.2. Le hairy root	5
2- <i>Agrobacterium</i> .	6
2.1. Description	6
2.2. Classification	8
3- Relations <i>Agrobacterium</i> -Plante	10
3.1. Organisation générale des plasmides Ti et Ri	10
3.1.1. la région de virulence	10
3.1.2. la région du catabolisme des opines	14
3.1.3. la région T	14
3.1.4. relations entre plasmides Ti et Ri	16
3.1.5. données à partir des séquences nucléotidiques	16
3.2. Bases moléculaires de l'interaction bactérie-plante	18
3.2.1. reconnaissance et attachement des bactéries aux cellules végétales blessées	18
3.2.2. induction du système de virulence bactérien	19
3.2.3. formation du complexe nucléoprotéique transféré	21
3.2.4. intégration du T-DNA dans le génome nucléaire de la plante	26
3.2.5. expression des gènes du T-DNA	27
3.3. Les opines	28
3.3.1. structure.	28
3.3.2. importance dans l'interaction <i>Agrobacterium</i> -plante	28
3.4. Classification des plasmides	30
4- Les oncogènes du T-DNA	33
4.1. Oncogènes du T-DNA des plasmides Ti	34
4.1.1. les oncogènes principaux	34
4.1.2. les autres différents oncogènes	35
4.2. Oncogènes du T-DNA des plasmides Ri	36
4.2.1. structure du T-DNA	36
4.2.1.1. <i>TR-DNA</i>	37
4.2.1.2. <i>TL-DNA</i>	38
4.2.2. les différents oncogènes	40
4.2.2.1. <i>rolA</i>	42
4.2.2.2. <i>rolB</i>	43
4.2.2.3. <i>rolC</i>	46
4.2.2.4. <i>rolD</i>	47
4.2.2.5. <i>ORF13</i>	49
5- Les autres ORFs	51
5.1. ORF3	51
5.2. ORF8	51

<b>Chapitre II - MATERIELS ET METHODES</b>	<b>55</b>
1- Matériels.	55
1.1. Souches bactériennes et milieux de culture	55
1.2. Plasmides utilisés	56
1.3. Matériel végétal et conditions de culture	57
2- Méthodes	57
2.1. Techniques de biologie moléculaire	57
2.1.1. manipulations courantes	57
2.1.2. construction des plasmides	57
2.1.2.1. <i>clonage de l'ORF8 sous son propre promoteur</i>	57
2.1.2.2. <i>clonage de l'ORF8 sous le contrôle du promoteur 35S de CaMV</i>	59
2.1.2.3. <i>clonage du promoteur ORF8 en amont du gène uidA</i>	61
2.1.3. amplification par PCR	61
2.1.3.1. <i>amplification du promoteur minimal 35S</i>	62
2.1.3.2. <i>analyse par PCR et RT-PCR de l'ORF8</i>	62
2.1.4. extraction d'ADN génomique de tabac	63
2.1.5. séquençage d'ADN	64
2.2. Techniques de biologie végétale	64
2.2.1. obtention de plantes transgéniques	64
2.2.2. germination des graines	65
2.2.3. induction racinaire sur disques foliaires	66
2.2.4. métabolisme du NAA chez les plantules transgéniques	66
2.2.4.1. <i>mesure de l'incorporation de l'auxine</i>	66
2.2.4.2. <i>analyse des dérivés métaboliques</i>	66
2.2.5. mesure de l'activité GUS	66
2.2.6. ultrastructure cellulaire des cotylédons	67
2.3. Recherche des homologues de séquences	68
<b>Chapitre III - RESULTATS</b>	<b>69</b>
1- Morphogenèse des plantes de tabac transgéniques	69
1.1. Caractérisation des plantes transgéniques	69
1.1.1. résistance à la kanamycine	69
1.1.2. intégration de l'ORF8 dans le génome de plantes de tabac	69
1.1.3. recherche des transcrits	70
1.2. Phénotype des plantes transgéniques	71
1.3. Structure et ultrastructure cellulaires des cotylédons	74
2- Réponses des tissus transgéniques à l'auxine exogène	76
2.1. Résistance à l'auxine	76
2.1.1. germination des graines en présence d'auxine	76
2.1.2. induction par l'auxine de la rhizogénèse sur disques foliaires	79

2.2. Métabolisme du NAA	79
3- Expression et inductibilité du promoteur de l'ORF8	80
3.1. Activité GUS	80
3.1.1. spécificité tissulaire de l'expression	80
3.1.2. activation du promoteur de l'ORF8 par l'auxine	81
<b>Chapitre IV - DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>85</b>
1- Phénotype des plantes pro8-ORF8 et 35S-ORF8	86
2- Résistance à l'auxine	87
3- Activité tryptophane-2-monooxygénase (T2M)	89
4- Expression et inductibilité de l'ORF8	91
<b>CONCLUSION</b>	<b>93</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>94</b>
<hr/>	
<b>ANNEXES</b>	Annexes
Annexe 1 - Séquence nucléotidique de la jonction Pro8-GUS.	Annexes
Annexe 2 - Séquence du promoteur minimal 35S.	Annexes
Annexe 3 - Séquences de l'ORF8	Annexes
3.1. Séquence nucléotidique de la partie codante de l'ORF8	
3.2. Séquence protéique de l'ORF8	
Annexe 4 - Article "The T-DNA ORF8 of the cucumopine-type <i>Agrobacterium rhizogenes</i> Ri plasmid is involved in auxin response in transgenic tobacco"	Annexes

## Présentation du travail

Au moment, où le travail que nous allons présenter a débuté, aucune fonction n'avait été identifiée pour l'ORF8. La plupart des travaux étaient orientés sur la recherche des fonctions des différents gènes *rol* du T-DNA du pRiA4.

La recherche d'homologie entre les T-DNA des plasmides Ti et Ri a été entreprise dans plusieurs laboratoires (Costantino *et al.*, 1981 ; Spano *et al.*, 1982; Combard *et al.*,1987; Filitici *et al.*,1987) afin de déterminer les fonctions de pathogénicité des plasmides Ri. Dans le laboratoire de l'ISV-CNRS où ce travail a été effectué, Brevet et Tempé (1988) avaient montré que l'ORF8 était un des gènes les mieux conservés de la partie commune appartenant aux différents plasmides Ri.

Par ailleurs Levesque *et al.* (1988) ont montré l'homologie structurale de cet ORF avec le gène *tms1* d'*Agrobacterium tumefaciens* et le gène *iaaM* de *Pseudomonas savastanoi* suggérant par là, une possible homologie fonctionnelle ou une implication de l'ORF8 dans la formation d'un composé "relié" à l'auxine et/ou dans des réponses altérées à l'auxine.

Partant de ces faits, il nous a paru intéressant d'essayer de comprendre le rôle joué par ce gène dans le syndrome complexe du hairy root. Dans ce but, nous avons :

- tout d'abord, analysé les effets de la partie codante de l'ORF8 de pRi2659 de la souche d'*Agrobacterium rhizogenes* à cucumopine, placée sous le contrôle de son propre promoteur et du promoteur 35S de CaMV, sur la morphogenèse de plantes transgéniques de tabac,
- ensuite, étudié les réponses des tissus transgéniques à l'auxine exogène,
- et enfin, essayé de connaître l'expression et l'inductibilité du promoteur de l'ORF8 grâce à la fusion de cette région régulatrice avec le gène *uidA*, responsable de la  $\beta$ -glucuronidase.

## Chapitre I

### INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Dans cette introduction bibliographique, nous avons essayé de faire le point de connaissances actuelles sur certains aspects de l'interaction *Agrobacterium*-plantes, en insistant surtout sur les oncogènes d'*Agrobacterium rhizogenes* en relation avec le sujet de notre travail. Nous utiliserons tout au long de ce manuscrit le terme « T-DNA » pour désigner l'ADN transféré, et les termes anglophones de « hairy root » et « crown gall », universellement acceptés et reconnus pour désigner les pathologies induites par la bactérie.

#### Introduction

*Agrobacterium* est une bactérie du sol, gram négatif appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*. Le genre *Agrobacterium* regroupe à la fois des saprophytes et des parasites. Les deux espèces les mieux connues sont les bactéries pathogènes de plantes : *A. tumefaciens* et *A. rhizogenes*. De nombreuses dicotylédones et certaines espèces de monocotylédones peuvent être infectées par ces deux espèces d'*Agrobacterium* (De Cleene et De Ley, 1976 ; Porter, 1991). *A. tumefaciens* induit la formation d'une tumeur indifférenciée ou crown gall (galle du collet) au niveau du site d'infection, alors que les infections par *A. rhizogenes* sont caractérisées par une production massive de racines adventives, avec de nombreux poils absorbants, appelée hairy root.

La plupart des tumeurs et racines sont caractérisées par la présence de molécules de faible poids moléculaire, appelées opines. Ces opines dérivent le plus souvent de sucres ou d'acides aminés. Leur synthèse dans les racines du hairy root ou les tumeurs de crown gall se fait aux dépens des réserves métaboliques du végétal. Les opines ne sont pas métabolisées par la plante mais sont excrétées dans l'environnement où elles sont métabolisées par *Agrobacterium* donnant très probablement à cette bactérie un avantage sélectif sur les autres bactéries du sol (Goldmann *et al.*, 1968 ; Petit *et al.*, 1970).

L'*Agrobacterium* a la capacité exceptionnelle de transférer un fragment d'ADN (T-DNA) du plasmide Ti (Tumor inducing) ou Ri (Root inducing) vers le noyau des cellules infectées, où il est ensuite intégré de façon stable, et transcrit, provoquant ainsi la maladie du crown gall ou du hairy root.

## 1- La maladie

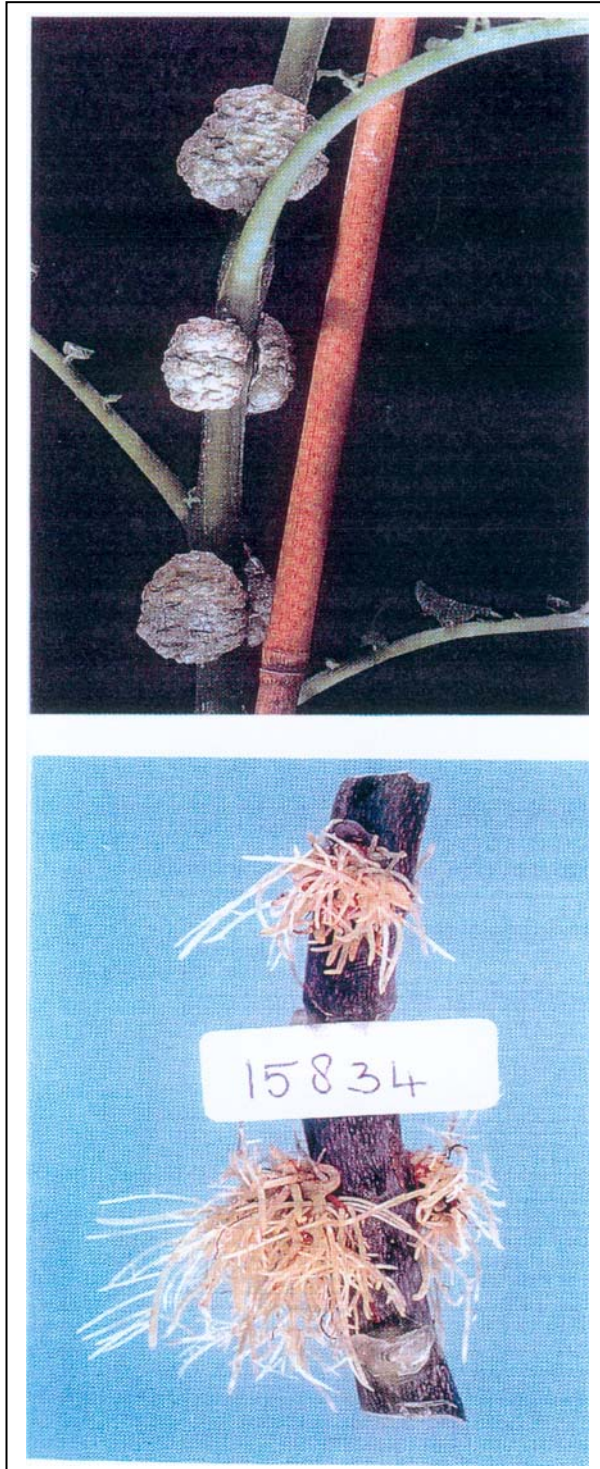
### 1.1. La galle du collet ou « crown gall »

Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, plusieurs études ont porté sur cette maladie, la principale raison de cet intérêt étant que crown gall était considérée comme un problème majeur dans les pépinières d'amandiers, de pommiers, de pêchers, et de pruniers. Ce sont toutes des espèces ligneuses qui sont propagées par greffage de boutures. Ces greffes provoquent des blessures qui sont généralement recouvertes de terre et fournissent ainsi un excellent point d'entrée pour les agrobactéries (Smith et Townsend, 1907 ; Kerr, 1969 ; Figure 1-A). D'autres espèces telles que le rosier, le chrysanthème, la vigne sont également sensibles à *Agrobacterium* (Bush et Pueppke, 1991 ; Ophel et Kerr, 1990). En raison de leur grande sensibilité au crown gall, des plantes telles que le datura (*Datura stramonium*) et le tournesol (*Helianthus annuus*) sont utilisées comme hôtes au cours d'essais, pour analyser le degré de virulence d'*A. tumefaciens*. Le kalanchoé (*Kalanchoe daigmontiana*) est également utilisé au laboratoire, quoiqu'il constitue un hôte moins sensible que le datura.

Au départ, l'effort scientifique a porté sur les recherches des mécanismes d'induction de la tumeur de crown gall, dans l'espoir de comprendre le mécanisme de l'oncogenèse en général et appliquer ces connaissances au développement du traitement du cancer chez les animaux et les humains.

Les tumeurs de crown gall peuvent s'observer non seulement au niveau du collet, partie de la plante située à la jonction tige-racine mais aussi sur des racines, des tiges et plus rarement des feuilles. On peut les induire expérimentalement par blessure et inoculation sur de nombreux hôtes. Ces tumeurs dont l'extension peut-être parfois considérable, détournent les flux de métabolites de la plante, abaissant par-là même la croissance, la vigueur et le rendement. Sur des tissus jeunes, leur développement peut conduire à un « étranglement » des tiges ou des racines, et à un arrêt de la circulation de la sève.

En 1907, Smith et Townsend identifient la nature bactérienne de la galle du collet en isolant l'agent responsable, *Bacterium tumefaciens*, devenu par la suite *Agrobacterium tumefaciens*. Avec les progrès de la culture *in vitro*, Braun et White en 1943 montrent que l'on peut, à la différence des tissus normaux, cultiver les tissus tumoraux et les entretenir de façon indéfinie sur un milieu simple contenant seulement du saccharose et des sels minéraux, la prolifération se poursuivant en l'absence de la bactérie pathogène. Une modification identique est observée après greffe de fragments de tumeur sur des plantes saines (Braun et White, 1943).



A

**Figure 1 :**

A- Tumeurs de crown gall sur une tige de pomme de terre, induite par *Agrobacterium tumefaciens*.

B- Hairy root sur une tige de Kalanchoé, induite par *Agrobacterium rhizogenes* (in : The Rhizobiaceae, H.P. Spunck, A. Kondorosi et P.J.J. Hooykaas, eds.1998 ; Dordrecht : Kulwer press).

B

Ces observations conduisirent les auteurs à conclure que les bactéries avaient modifié de façon permanente le potentiel de prolifération des cellules de l'hôte, et à émettre l'hypothèse de l'existence d'un « principe inducteur de tumeur » (T.I.P. pour Tumor Inducing Principle) d'origine bactérienne et capable d'induire une transformation tumorale permanente des cellules végétales (Braun, 1947).

Ce n'est que 30 ans après les travaux de White et Braun que les preuves expérimentales de l'existence du T.I.P. furent apportées. En 1974, le pouvoir pathogène d'*A. tumefaciens* est lié à la présence d'un plasmide de grande taille (200 à 400kb) désigné sous le nom de plasmide Ti (Tumor inducing) (Zaenen *et al.*, 1974; van Larebecke *et al.*, 1974 ; Watson *et al.*, 1975). Par la suite, Chilton *et al.* (1977) démontrent, par hybridation moléculaire, la présence d'un fragment du plasmide Ti dans le génome nucléaire des cellules tumorales. Cet ADN transféré ou « T-DNA » (Transferred DNA), est un fragment défini du plasmide Ti. Ce T-DNA porte deux types de gènes. Les premiers confèrent aux cellules végétales un phénotype tumoral, caractérisé par la prolifération cellulaire, et les seconds la capacité de synthétiser les opines.

## 1.2. Le hairy root

Initialement, la maladie du hairy root a été étudiée parce qu'elle provoquait de grandes pertes financières dans les pépinières de pommiers (Hildebrand, 1934). Dans la nature, le hairy root a été observé sur un nombre limité d'espèces de plantes : le pommier (Smith, 1907 ; Riker *et al.*, 1930 ; Hildebrand, 1934), le concombre (Davioud *et al.*, 1988) et le melon (Isogaï *et al.*, 1990 ; Figure 1-B).

La biologie générale du processus d'infection semble être similaire à celle d'*A. tumefaciens*. Comme pour le crown gall, les symptômes du hairy root ont pour base moléculaire un transfert naturel de gènes dans le génome nucléaire des cellules végétales. L'agent responsable, *A. rhizogenes*, fut identifié en 1930 par Riker *et al.* Il induit, aux sites blessés et inoculés, une prolifération de cellules se différenciant en racines. Le pouvoir pathogène est, comme pour *A. tumefaciens*, porté par un plasmide de haut poids moléculaire, le plasmide Ri (Root inducing) (Moore *et al.*, 1979). Comme dans le cas d'*A. tumefaciens* le transfert, l'intégration et l'expression d'une partie de ce plasmide, le T-DNA, conduisent aux symptômes de la maladie (Chilton *et al.*, 1982). Parmi les résultats marquants de la progression des connaissances du hairy root, on notera la mise en évidence de la présence d'opines caractéristiques dans les racines transformées (Tepfer et Tempé, 1981).

Les racines transformées, une fois excisées, peuvent être facilement cultivées *in vitro* en l'absence de la bactérie. Les racines de hairy root se différencient des racines normales par leurs nombreuses ramifications latérales, leur agéotropisme et leur capacité à se multiplier rapidement sur un milieu dépourvu d'hormones de croissance (Capone *et al.*, 1989a ; David *et al.*, 1984 ; Figure 2). Il en résulte une biomasse importante en un temps relativement court (Davioud *et al.*, 1989 ).

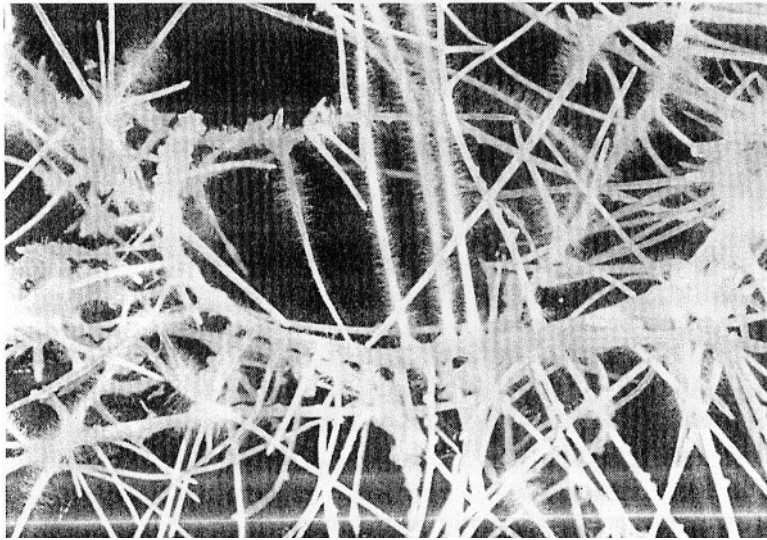
Chez de nombreuses espèces de plantes, il est possible d'induire une régénération du végétal à partir de ces racines, avec un phénotype caractérisé le plus souvent par des feuilles gaufrées, des internœuds plus courts et une dominance apicale réduite ( Spano *et al.*, 1982 ; Tepfer, 1984 ; Figure 3). Toutes les cellules d'une racine de hairy root dérivent d'une cellule d'un méristème transformée et constituent un clone (Costantino *et al.*, 1984 ; David *et al.*, 1984), contrairement à celles de la tumeur de crown gall qui est une chimère, mélange de cellules transformées et de cellules normales (Sacritan et Melchers, 1977). Comme les cellules de crown gall, celles du hairy root possèdent dans leur génome le T-DNA du plasmide Ri d'*A. rhizogenes*, porteur d'informations génétiques transmises à la descendance (David *et al.*, 1984 ; Costantino *et al.*, 1984).

## **2- *Agrobacterium***

### **2.1. Description**

Les agrobactéries vivent dans le sol et plus spécialement dans la rhizosphère. Elles ont pu être isolées dans à peu près tous les pays du monde (Bergey, 1984).

Ces bactéries se présentent sous forme de bacilles de 0,6 à 1µm de largeur et de 1,5 à 3µm de longueur. Elles sont mobiles grâce à 1 à 6 flagelles et ne forment pas de spores. Elles vivent en aérobiose, car elles possèdent un métabolisme du type respiratoire, avec l'oxygène comme accepteur final d'électron. Elles sont toutefois capables de croître sous des tensions réduites d'oxygène dans les tissus de la plante et pour certaines, en anaérobiose en présence de nitrate. La température optimale de croissance se situe entre 25°C à 28°C. En milieu solide, elles forment des colonies convexes, circulaires, lisses et de couleur beige clair (Kerstens et De Ley, 1984).



**Figure 2** : Racines de pois transformées par *Agrobacterium rhizogenes*, cultivées sur milieu Murashige et Skoog pendant 2 semaines (Bercetche *et al.*, 1987).



**Figure 3** : Plantes de tabac ; normale (N), transformée par par *Agrobacterium rhizogenes* (T).

## 2.2. Classification

Le genre *Agrobacterium* appartient à la famille des *Rhizobiaceae* (Bergey, 1984). Sa classification initiale fut basée sur le pouvoir pathogène et le type de symptômes induits. Il comprend au moins cinq espèces :

- A. tumefaciens*, espèce la plus connue, agent du crown gall (Smith et Townsend, 1907) ;
- A. rhizogenes*, responsable du hairy root (Riker *et al.*, 1930) ;
- A. rubi*, induisant la formation de tumeurs aériennes sur *Rubus* sp. notamment (Kerstens et De Ley, 1984) ;
- A. vitis*, responsable du crown gall de la vigne (Ophel et Kerr, 1990) ;
- A. radiobacter*, regroupant des souches non pathogènes, ayant probablement perdu leur plasmide Ti (Bergey, 1984).

Cette classification se fonde sur des caractères phytopathologiques liés à la présence des plasmides Ti ou Ri, éléments mobiles du génome, pouvant être perdus ou acquis par conjugaison. De tels caractères ne permettent pas de générer une classification stable.

Diverses méthodes ont été utilisées pour étudier les espèces naturelles du genre *Agrobacterium* comme l'analyse numérique des caractéristiques phénotypiques (Kerstens *et al.*, 1973), les tests biochimiques et physiologiques (Keane *et al.*, 1970 ; Kerr et Panagopoulos, 1977), les mesures de la stabilité des hybrides ADN/ADN (De Ley *et al.*, 1973), la comparaison des électrophorégrammes de protéines solubles (Kerstens et De Ley, 1975) et les profils des acides gras (Sawada *et al.*, 1992 ; Bouzar *et al.*, 1993). Les résultats obtenus par toutes ces méthodes, indiquent l'existence de trois groupes génétiquement et phénotypiquement distincts, n'incluant pas *Agrobacterium rubi*. Ces groupes correspondent aux biotypes (ou biovars) 1, 2, et 3 déterminés par Keane *et al.*, dès 1970, reconnus par la suite comme espèces (Bradbury, 1986 ; Sawada *et al.*, 1993). Chez *Agrobacterium*, il est généralement admis que les biovars (ou biotypes) ont un statut d'espèces.

Le biotype I comprend la plupart des souches d'*A. tumefaciens*. Il inclut la souche type *A. tumefaciens* selon ses caractères pathogéniques tumoraux aussi bien que la souche type *A. radiobacter* non pathogène alors que la majorité des souches d'*A. rhizogenes* appartiennent au biotype II. Cependant la souche *A. rhizogenes* 2659 appartient au biotype I (Costantino *et al.*, 1981). Le biotype III regroupe les souches d'*A. vitis* (Tableau 1). *A. rubi* définirait au moins un quatrième biotype caractérisé en termes génotypique et phénotypique.

**Tableau 1 :** Quelques caractères distinctifs des différents biotypes (d'après Kerr et Panagoupolos, 1977 ; Kersters et De Ley, 1984 ; Ophel et Kerr, 1990).

Caractéristique	Biotype I	Biotype II	Biotype III
production de 3-céto-lactose	+	-	-
croissance en présence de 2% NaCl	+	-	+
température maximale de croissance	37°C	29°C	35°C
production d'acide à partir de l'érythritol	-	+	-
mobilité à pH 7,0	+	+	-

Plusieurs révisions de la classification des espèces *d'Agrobacterium* ont été proposées depuis ces dernières années, puisque la véritable structure taxonomique du genre doit se fonder sur des caractéristiques génotypiques des différentes souches (Sawada *et al.*, 1993 ; Willems et Collins, 1993). L'émergence de nouvelles techniques telles que l'amplification par PCR de l'ADN codant l'ARNr 16S, l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques ou l'analyse des profils d'acides gras permettent actuellement de mettre en place une nouvelle taxonomie des agrobactéries. L'étude du gène déterminant l'ARN ribosomique 16S (*rrs16S*) et la comparaison de ses séquences a permis l'établissement d'arbres phylogénétiques qui remettent en cause les classifications établies à partir de critères phénotypiques (Bishop *et al.*, 1989 ; Bouzar *et al.*, 1993 ; Ponsonnet et Nesme, 1994 ).

Récemment, Young *et al.*, (2001) proposèrent une nouvelle taxonomie des agrobactéries. Il a été remarqué qu'*Agrobacterium*, genre contenant des espèces phytopathogènes est étroitement relié à *Rhizobium*. Basées sur la comparaison de l'ADNr du 16S, les espèces d'*Agrobacterium*, *A. tumefaciens* (= *A. radiobacter*), *A. rhizogenes*, *A. rubi* et *A. vitis* ainsi que *Allorhizobium undicola* (De Lajudie *et al.*, 1998), forment un groupe de nature monophylétique avec toutes les espèces de *Rhizobium*. La fusion des deux genres *Agrobacterium* et *Rhizobium* a souvent été suggérée (Kerr, 1992 ; Sawada *et al.*, 1993 ; Willems et Collins, 1993), et il est donc proposé de les réunir en un seul genre, redéfini comme *Rhizobium*. L'épithète *tumefaciens* étant étroitement associé à la 'tumurogénéicité' pourrait être remplacé par *radiobacter*, épithète ayant la priorité chronologique par rapport à *tumefaciens*. Ainsi, les nouvelles combinaisons proposées par Young *et al.*, (2001) sont : *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. vitis* et *R. undicola* (Young *et al.*, 2001).

Néanmoins, cette classification ne faisant pas l'unanimité chez les microbiologistes, les termes admis d'*Agrobacterium tumefaciens* et *A. rhizogenes* seront utilisés, tout au long de ce travail.

### 3- Relations *Agrobacterium*-plante

#### 3.1. Organisation générale des plasmides Ti et Ri

Les plasmides Ti et Ri, déterminants essentiels de la pathogénicité des agrobactéries, ne sont présents qu'en un seul exemplaire dans les bactéries qui les hébergent. Ce sont des plasmides de haut poids moléculaire. A titre d'exemple, le plasmide Ri2659 de la souche d'*A. rhizogenes* a une taille d'environ 200kb (Costantino *et al.*, 1981). Ces mégaplasmides sont constitués d'un nombre de régions fonctionnelles qui sont : la région de l'origine de réplication (*ori*) et la région d'incompatibilité (*inc*); les gènes de transfert conjugatif (*tra*) ; les gènes de virulence (*vir*) ; les gènes du catabolisme des opines (*opc*) et les gènes du T-DNA (voir Figure 4 et Figure 5). Par conséquent, ces plasmides peuvent être considérés comme un assemblage de groupes de gènes indépendants. Cette structure en « mosaïque » des plasmides Ti /Ri proviendrait probablement d'un transfert horizontal d'ADN. Un mécanisme de transposition a été proposé. Ainsi, dans le cas des plasmides Ti à octopine et du chromosome de *P. savastanoï*, les gènes *iaa* sont dans les 2 cas, liés à un élément IS51-like (Ottens *et al.*, 1992).

Sur le plan fonctionnel, on peut distinguer 2 groupes de gènes. Le premier constitué de la région *ori*, des gènes *tra*, des gènes *vir* et des gènes *opc*, est exprimé dans un contexte bactérien, le second (gènes du T-DNA) est exprimé dans un environnement eucaryote (plante). Les régions du 1<sup>er</sup> groupe, non transférables à la cellule végétale, des plasmides Ti et Ri sont très comparables. Cependant, trois régions sont essentielles à l'interaction avec la plante, il s'agit de la région de virulence, la région du catabolisme des opines et la région-T que nous décrirons dans les paragraphes suivants.

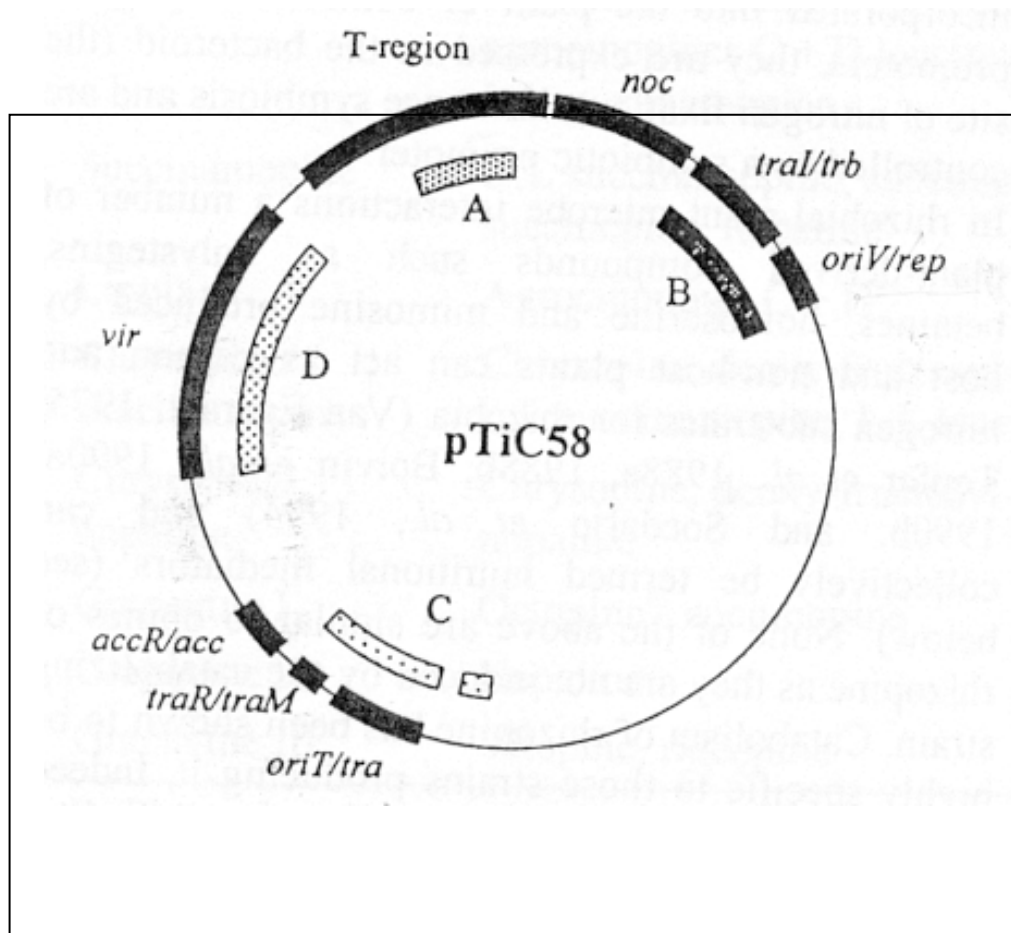
##### 3.1.1. Région de virulence

Il existe une forte homologie de séquence entre les régions *vir* des plasmides Ti et Ri (Hooykaas *et al.*, 1984 ; Huffman *et al.*, 1984 ; Jouanin, 1984 ). De plus, les fonctions *vir* des pTi sont capables de mobiliser le T-DNA porté par un plasmide Ri, et *vice-versa*. La région *vir* est une région d'environ 30-40kb, indispensable au transfert et à l'intégration du T-DNA dans le génome végétal. Elle est située proche de la frontière gauche du T-DNA. Cette région est composée d'au moins 6 opérons essentiels au transfert du T-DNA (*virA*, B, C, D, E, G), et 2

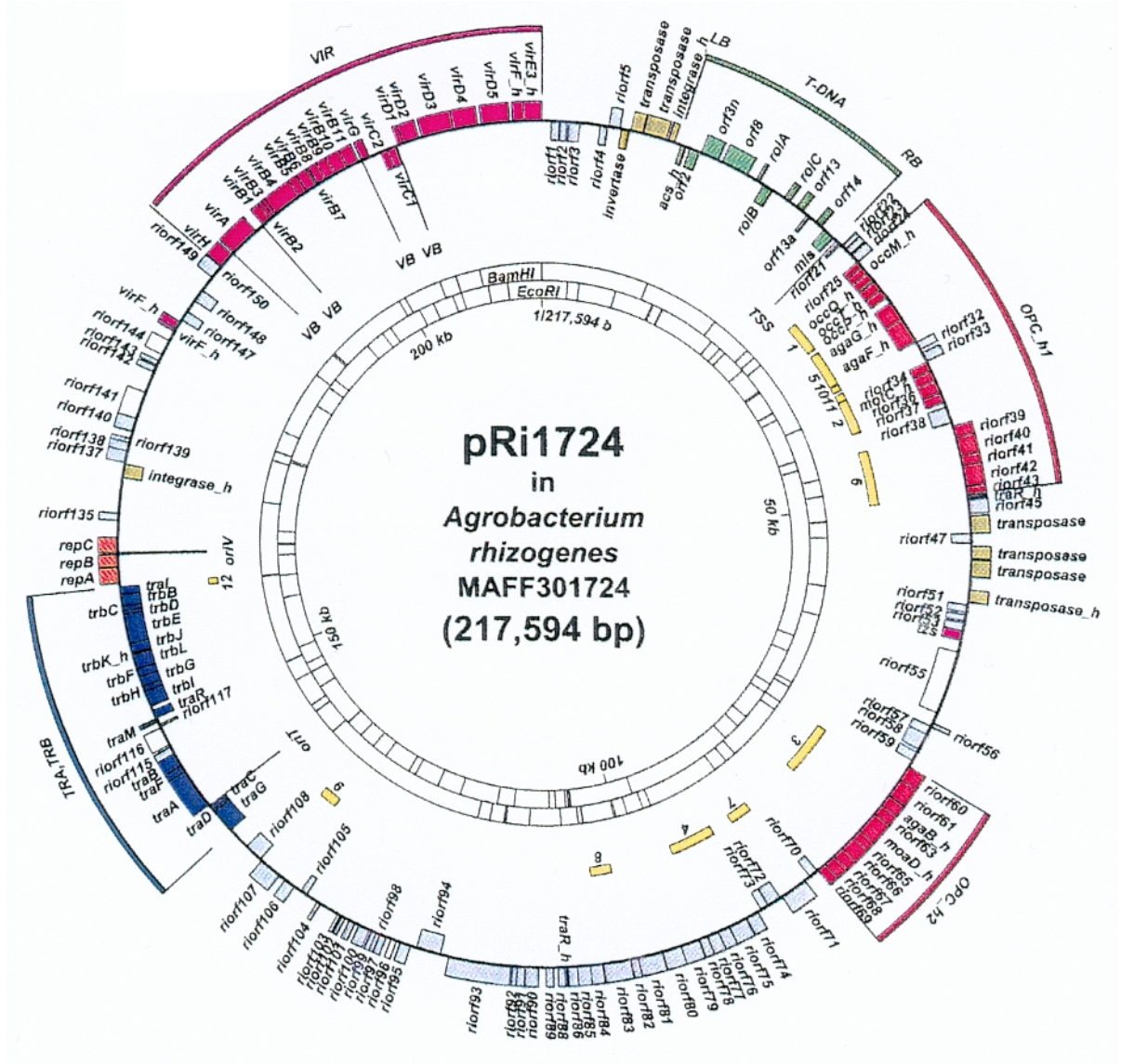
opérons non essentiels (*virF*, H). Le nombre de gènes pour chaque opéron est différent. Le Tableau 2 présente les principaux gènes *vir* du plasmide Ti à octopine et leurs fonctions.

Dans le cas des plasmides Ti à octopine, une séquence spécifique accroît l'efficacité du transfert : l'overdrive, qui est située près de la frontière droite du T-DNA (Peralta *et al.*, 1986).

Dans le cas des plasmides Ri, on trouve, à la place de l'overdrive, des séquences répétées de 8pb, appelées séquences stimulatrices du transfert du T-DNA (TSS). Le plasmide pRi2659 possède 16 séquences répétées, alors que pRi1724 en possède 12 et pRiA4 n'en a que 6 (Hansen *et al.*, 1992 ; Moriguchi *et al.*, 2001).



**Figure 4** : Organisation fonctionnelle du plasmide pTiC58 d'*Agrobacterium tumefaciens*. T-région : T-DNA ; *vir* : région de virulence ; *oriV/rep* : origine de répliation du plasmide ; *traI/trb* : région de transfert ; *oriT/tra* : origine du transfert du plasmide ; *traR/traM* : région impliquant la régulation du transfert du plasmide ; *accR/acc* : catabolisme de l'agrocinopine ; *noc* : catabolisme de la nopaline. Les régions A, B, C et D présentent de fortes similarités de séquences avec les régions correspondantes du plasmide pTi15955 (d'après Dessaux *et al.*, 1998 ; voir Figure7).



**Figure 5 :** Carte génétique du plasmide pRi1724. Les différents groupes de gènes ou ORFs sont représentés. On distingue la région de virulence (VIR) ; la région-T (T-DNA) ; la région du transfert conjugatif (TRA, TRB) ; la région du catabolisme des opines (OPC\_h1, OPC\_h2) ; les gènes de l'origine de répliation (oriV). Les gènes et les ORFs à l'extérieur du cercle sont transcrits dans le sens des aiguilles d'une montre et ceux à l'intérieur le sont dans le sens contraire (d'après Moriguchi *et al.*, 2001).

**Tableau 2** : Fonctions des principaux gènes de virulence du plasmide Ti à octopine.

Gène (s)	Taille kb	Nombre d'ORF	Fonction
<b>virA</b>	2,8	1	-perçoit les molécules signal (Pan <i>et al.</i> , 1993). -transduit le signal à VirG avec lequel il forme un système de régulation à 2 composantes (Winans, 1992).
<b>virB</b>	9,5	11	-permet le passage à travers la membrane bactérienne ; forme un canal ou un pore (Shirasu et Kado, 1993a ; 1993b ; Shirasu <i>et al.</i> , 1994 ; Stephens <i>et al.</i> , 1995 ; Das et Xie, 1998), constitue un système de sécrétion de type IV(Christie, 2001).
<b>virC</b>	1,5	2	- <b>C1</b> : reconnaît l'overdrive (Toro <i>et al.</i> , 1989). - <b>C2</b> : reconnaissance de la frontière droite (Hille <i>et al.</i> , 1983 ; Peralta et Ream, 1985). -augmente la production du brin-T.
<b>virD</b>	4,5	4	- <b>D1</b> : topoisomérase (Ghai et Das, 1989). - <b>D2</b> : endonucléase, se fixe à l'extrémité 5' du brin-T qu'elle pilote ; transfère le brin-T de la bactérie au noyau (Tinland <i>et al.</i> , 1995 ; Zupan et Zambryski, 1995). - <b>D4</b> : liaison ATP-dépendante au complexe-T ; requise pour l'exportation du brin-T/VirD2 et VirE2 (Lin et Kado, 1993 ; Christie, 2001).
<b>virE</b>	2,2	2	- <b>E1</b> : -intervient dans l'exportation de VirE2 vers la cellule végétale ; stabilise E2 (Binns <i>et al.</i> , 1995). - <b>E2</b> : - se lie au brin-T (Zupan <i>et al.</i> , 1996). - enveloppe le brin-T (Lessi <i>et al.</i> , 1994 ; Binns <i>et al.</i> , 1995 ; Zhu <i>et al.</i> , 2000). - intervient probablement dans l'incorporation du brin-T au noyau (Tinland <i>et al.</i> , 1995 ; Tinland, 1996 ; Zupan <i>et al.</i> , 1996).

<b>virG</b>	1,0	1	-activateur transcriptionnel (Jin <i>et al.</i> , 1990a ; 1990b ; Winans, 1992).
<b>virF</b>	1	1	-rôle en relation avec le « ciblage » du complexe T-DNA dans le noyau (Hooykass et Schilperoot, 1992).
<b>virH</b>	3,4	2	-rôle probable dans la spécificité d'hôte de la souche bactérienne pour les différentes espèces de plantes (Kanemoto <i>et al.</i> , 1989).

### 3.1.2. Région du catabolisme des opines

La région du catabolisme des opines est globalement appelée *opc*. Les gènes impliqués dans le catabolisme des opines sont regroupés en opéron : *noc* pour celui de la nopaline (Schardl et Kado, 1983), *occ* pour celui de l'octopine (De Greve *et al.*, 1981) et *acc* pour celui de l'agrocinopine (Hayman et Farrand, 1990). Pour être utilisées, les opines doivent pénétrer dans les bactéries. Ainsi, des protéines spécifiques sont nécessaires à leur transport. Les opines induisent leur propre catabolisme grâce à des protéines régulatrices qui, en leur présence, régulent l'expression des gènes de transport et de catabolisme. La Figure 6 représente l'organisation de l'opéron du catabolisme de l'agrocinopine de pTiC58 (Dessaux *et al.*, 1998).

Les déterminants génétiques impliqués dans la dégradation des opines sont souvent portés par les plasmides Ri. Cependant, et contrairement au cas d'*A. tumefaciens*, certains de ces déterminants sont localisés sur un autre réplicon qui peut cointégrer avec le plasmide Ri chez certaines souches d'*A. rhizogenes* (Petit *et al.*, 1983 ; Dessaux *et al.*, 1998).

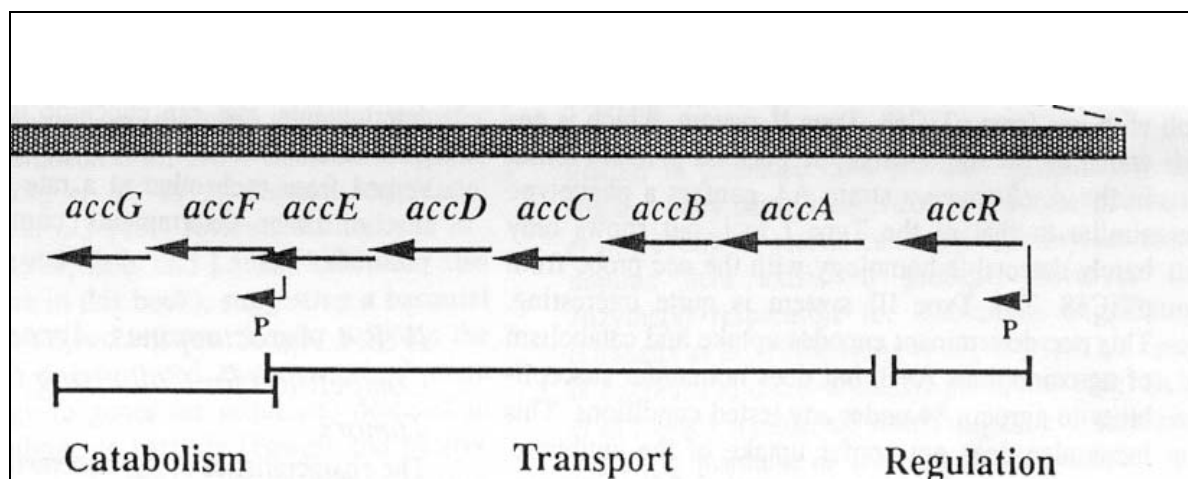
### 3.1.3. La région T

La région transférable est une région délimitée par des frontières gauche et droite (FG et FD) qui sont des séquences en répétition directes mais imparfaites de 24 à 25 pb (Jen et Chilton, 1986). Bien que les deux frontières soient fortement homologues, la frontière gauche semble ne pas avoir un rôle primordial, alors que la délétion ou l'inversion de la frontière droite annule le transfert du T-DNA (Zambryski, 1992).

Le T-DNA contient 2 types de gènes qui sont exprimés dans la cellule végétale :

- les gènes dits « oncogènes », par le fait que leur expression est directement responsable des symptômes tumoraux ou rhizogènes (voir § 4) et
- les gènes codant la synthèse des opines : composés produits généralement par condensation d'acides aminés et/ou de sucres qui sont excrétés par les cellules de crown gall et de hairy root.

Ces gènes appelés *ops* se trouvent en général près de la frontière droite du T-DNA. Plusieurs gènes de synthèse d'opine ont été mis en évidence ; quelques uns d'entre eux sont présentés dans le Tableau 3, ci-dessous.



**Figure 6** : Organisation structurale de l'opéron du catabolisme de l'agrocinopine (*acc*). La région *acc* est constituée du gène de régulation *accR* et des gènes impliqués dans l'incorporation et la dégradation de l'agrocinopine (tiré de Dessaux *et al.*, 1998).

**Tableau 3** : Les gènes de synthèse d'opines.

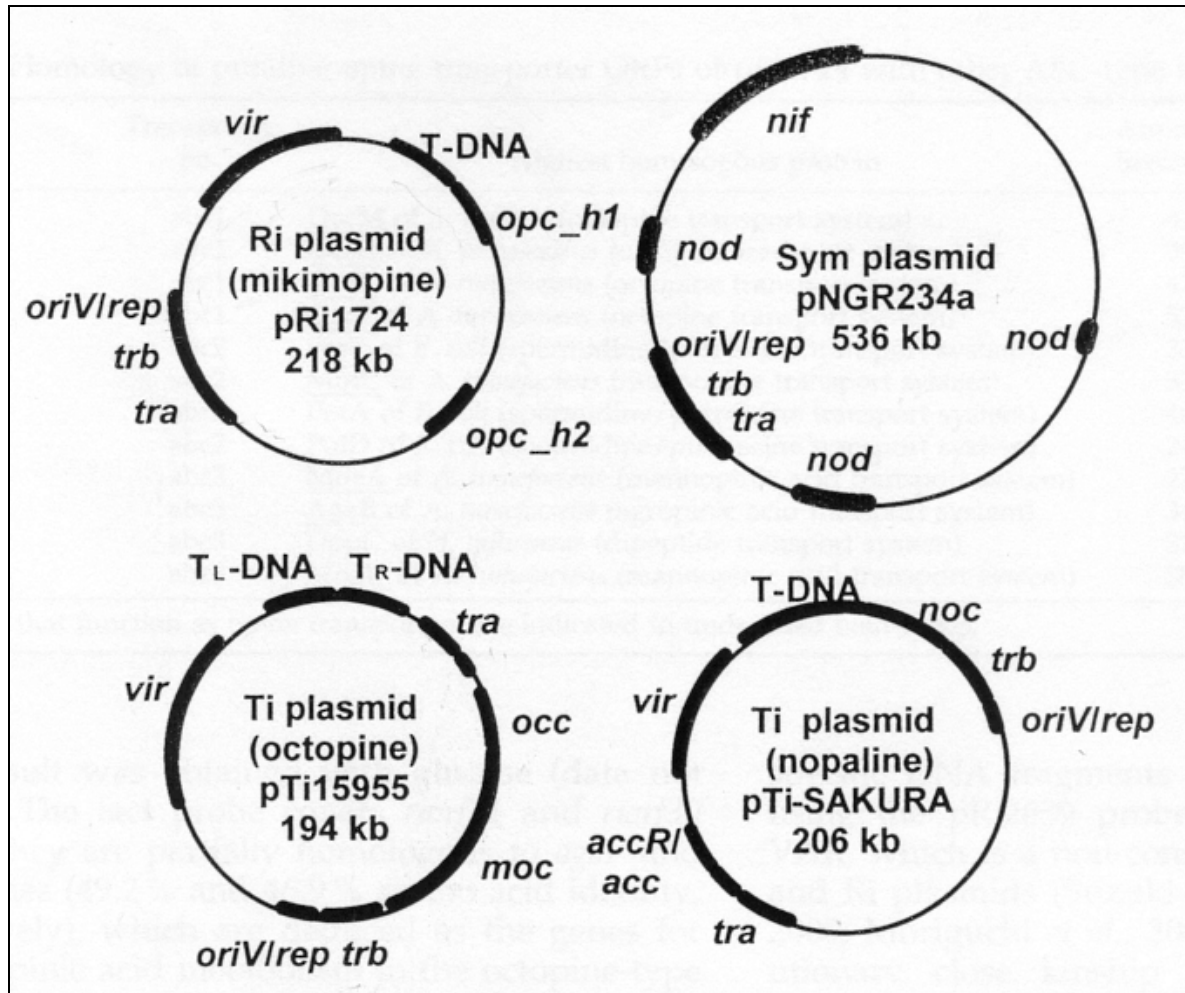
Gène	Produit	Fonction du produit	Références
<i>nos</i>	nopaline synthétase	synthèse de la nopaline et de l'acide nopalinique	Bevan <i>et al.</i> , 1983
<i>acs</i>	agrocinopine synthétase	synthèse d'agrocinopine	Joos <i>et al.</i> , 1983
<i>mas2'</i> et <i>mas1'</i>	conjugase et réductase	synthèse de mannopine	Ellis <i>et al.</i> , 1984
<i>ags</i>	cyclase	synthèse de l'agropine	Ellis <i>et al.</i> , 1984
<i>mis</i>	mikimopine synthétase	synthèse de la mikimopine	Suzuki <i>et al.</i> , 2001
<i>cus</i>	cucumopine synthétase	synthèse de la cucumopine	Brevet <i>et al.</i> , 1988

### 3.1.4. Relations entre plasmides Ti et Ri

Récemment, la détermination complète de séquences du plasmide Ti-SAKURA à nopaline (Hattori *et al.*, 2000.), celle du plasmide Ri1724 à mikimopine (Tanaka *et al.*, 1994 ; Moriguchi *et al.*, 2001 ; Figure 5) et celle du plasmide Sym (pNGR234a) (Freiberg *et al.*, 1997) ont permis de mettre en évidence les relations qui existent entre les plasmides pathogènes d'*Agrobacterium* et le plasmide symbiotique Sym de *Rhizobium* sp. (Moriguchi *et al.*, 2001). La Figure 7 montre que le plasmide Ri possède une caractéristique intéressante de structure chimérique, intermédiaire entre les plasmides Ti et le plasmide Sym. De plus, l'étude des homologues de séquences indique que les gènes et les éléments pour le transfert conjugatif de pRi1724 sont étroitement apparentés à ceux du plasmide Sym, pNGR234a de *Rhizobium* sp., plutôt qu'à ceux des plasmides Ti (pTi15955 et pTi-SAKURA) (Moriguchi *et al.* 2001). Cette structure suggère qu'au cours de l'évolution, les plasmides des *Rhizobiaceae*, semblent avoir interagi entre eux (Moriguchi *et al.* 2001).

### 3.1.5. Données à partir des séquences nucléotidiques

Il est également intéressant, de noter que le génome de la souche C58 d'*A. tumefaciens* a été entièrement séquencé (Goodner *et al.*, 2001 ; Wood *et al.*, 2001). Cette souche a une structure génomique inhabituelle. Elle porte un chromosome circulaire (2,84Mb) et un chromosome linéaire (2,07Mb), et deux plasmides : pAtC58 (0,54Mb) et pTiC58 (0,21Mb) à nopaline-agrocinopine. Les deux chromosomes contiennent tous les gènes codant les ARNs stables et les protéines impliquées dans les fonctions cellulaires essentielles et la croissance prototrophe. Le chromosome circulaire porte une origine de répllication (*Cori*) similaire à *Cori* de *Caulobacter crescentus*. Le chromosome linéaire possède un système de répllication de type plasmide, similaire à celui trouvé sur les plasmides pTiC58 et pAtC58, suggérant que le chromosome linéaire dérive peut être du point de vue évolutif, d'un plasmide. La densité des gènes est très similaire entre les deux chromosomes, cependant, les gènes impliqués dans la plupart des processus essentiels sont significativement surreprésentés sur le chromosome circulaire. Cependant, les gènes impliqués dans la transformation et la tuméfaction de la plante sont localisés sur les quatre réplicons (Goodner *et al.*, 2001 ; Wood *et al.*, 2001).



**Figure 7 :** Comparaison de l'organisation génétique des plasmides des *Rhizobiaceae*. Les différents gènes et régions de l'organisation fonctionnelle des plasmides Ti et Ri sont représentés (T-DNA, régions *vir*, *opc*). On note surtout la position des régions *oriV/rep*, *tra* et *trb* au niveau des quatre plasmides. *nif*, *nod*, *occ* et *moc* indiquent les régions codant la fonction de fixation de l'azote, la nodulation, du catabolisme de l'octopine et de la mannopine, respectivement (d'après Moriguchi *et al.*, 2001).

## 3.2. Bases moléculaires de l'interaction bactérie-plante

### 3.2.1. Reconnaissance et attachement des bactéries aux cellules végétales blessées

Dans les conditions naturelles, les cellules d'*A. tumefaciens* sont attirées vers les sites blessés, par chimiotactisme. Ceci est, en partie, une réponse à la libération de sucres et d'autres composés communs (acides aminés, dérivés phénoliques) exsudés par les plantes se produisant même lorsque les souches ont été curées de leur plasmide. Cependant, les agrobactéries qui hébergent le plasmide Ti répondent fortement parce qu'elles reconnaissent les composés phénoliques tels que l'acétosyringone, l'acide sinapinique, l'alcool coniférylique qui sont très attractifs même à très faible concentration (Winans, 1992). Ainsi, une des fonctions du plasmide Ti est de coder des récepteurs spécifiques qui sont insérés dans la membrane bactérienne et rendent *Agrobacterium* capable de reconnaître les cellules végétales blessées (Cf. § 3. 2. 2.)

La capacité d'attachement d'une bactérie sur les tissus végétaux est un facteur qui influe fortement sur le développement ultérieur de l'interaction pathogène. L'attachement d'*Agrobacterium* aux cellules de plantes fait intervenir différents éléments génétiques déterminés par le chromosome (Figure 8, étape 1) :

- les loci *chvA* et *chvB* sont impliqués dans la synthèse et l'excrétion du  $\beta$ -1-2-glucane (Cangelosi *et al.*, 1989) ;
- le locus *chvE* est requis pour la reconnaissance du sucre activateur de l'induction des gènes *vir* et du chimiotactisme bactérien (Ankenbauer et Nester, 1990) ;
- le locus *cel* est responsable de la synthèse des fibrilles de cellulose permettant un ancrage, assez faible toutefois, de la bactérie à la paroi végétale. (Matthysse, 1983) ;
- le locus *pscA* (*exoC*) joue un rôle dans la synthèse à la fois du cycle glucane et de l'acide succino glucane (Cangelosi *et al.*, 1987 ; 1991) ;
- le locus chromosomique *att* de 20kb est constitué de gènes requis pour l'attachement de la bactérie à la cellule végétale (Matthysse, 1986).

La colonisation bactérienne est une étape essentielle et très précoce dans l'induction tumorale. Elle se produit juste avant qu'*A. tumefaciens* s'attache à la surface cellulaire de la plante (Matthysse, 1996). A cet égard, un mutant *attR* d'*A. tumefaciens* qui a perdu la capacité à synthétiser des fibrilles de cellulose, est fortement affecté dans sa capacité à coloniser le système racinaire des plantes. Un tel mutant a également totalement perdu la capacité d'induire

le développement des tumeurs sur les plantes (Douglas *et al.*, 1982 ; Thomashow *et al.*, 1987 ; Matthyse, 1987 ; Bradley *et al.*, 1997 ; Matthyse et Mc Mahon, 1998 ). Les polysaccharides de la surface cellulaire semblent jouer un rôle important dans le processus de colonisation (Whattey et Spiess, 1977). Dans le cas d'*A. tumefaciens*, il a été observé que l'attachement de la bactérie à la plante était directement corrélé à la production d'un acide polysaccharidique (Bradley *et al.*, 1997).

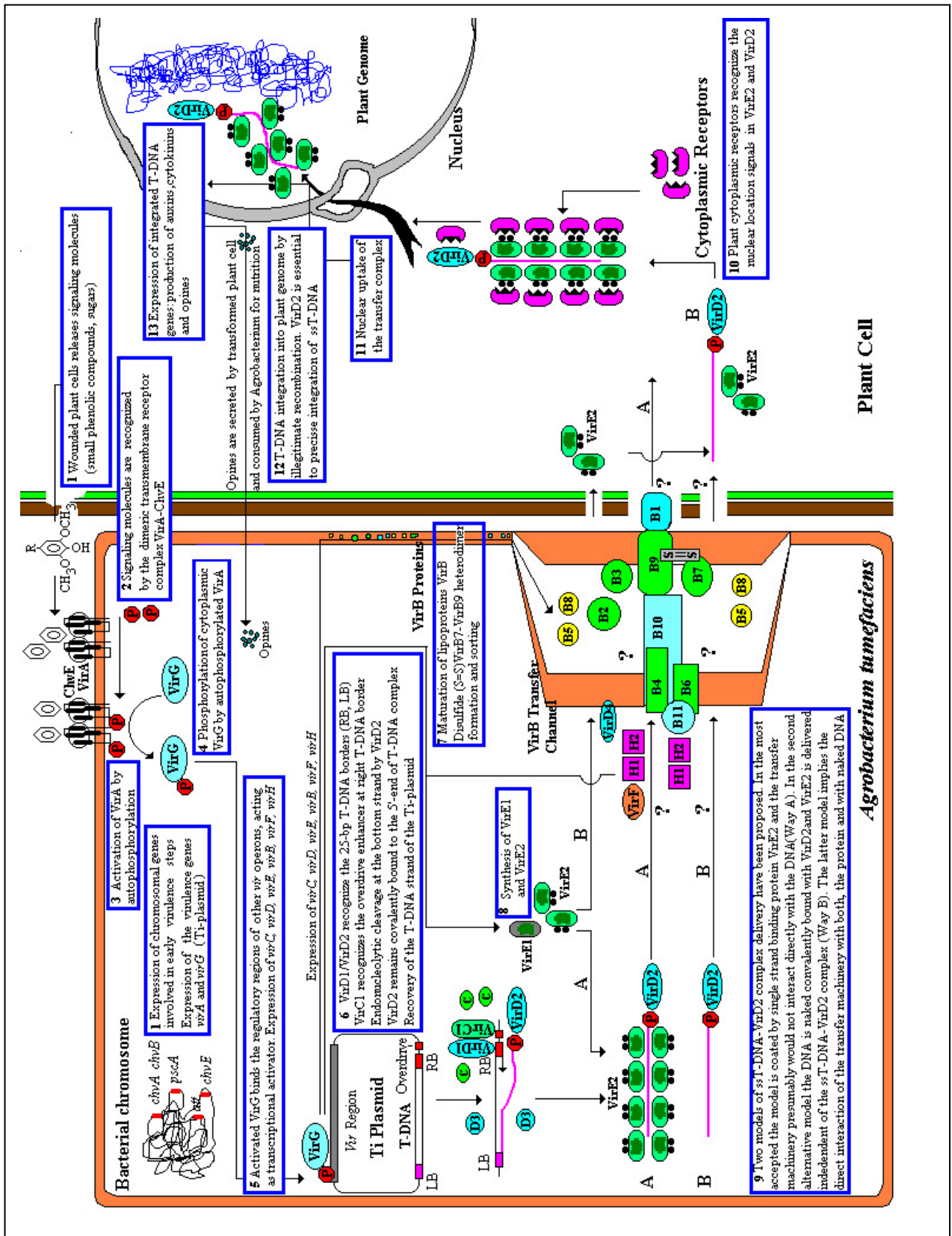
### 3.2.2. Induction du système de virulence bactérien

Le transfert du T-DNA est assuré par les produits des gènes de virulence, localisés dans la région dite *vir* du plasmide Ti (voir Tableau 2).

Les opérons *virA* et *virG* sont exprimés de façon constitutive et codent un système à 2 composantes activant la transcription des autres gènes *vir* (Winans *et al.*, 1994). Le système VirA-VirG possède des similitudes structurales et fonctionnelles avec des protéines senseur-régulateur des autres systèmes à 2 composantes, répondant à un signal spécifique de l'environnement (Gross *et al.*, 1989 ; Iuchi, 1993).

VirA est une protéine réceptrice transmembranaire qui détecte de façon générale l'environnement de la « plante blessée » (Pan *et al.*, 1993). Les signaux d'activation de VirA comprennent aussi bien le pH acide que les composés phénoliques libérés au niveau de la blessure, tel que acétosyringone (Winans, 1992), et ils incluent également une certaine classe de monosaccharides qui agissent en synergie avec les composés phénoliques (Ankenbauer et Nester, 1990 ; Cangelosi *et al.*, 1990 ; Shimoda *et al.*, 1990a ; Doty *et al.*, 1996 ; Figure 8, étape 1 et 2).

La protéine VirA présente 3 domaines, un domaine périplasmique et 2 domaines transmembranaires TM1 et TM2. Ceux-ci agissent comme un système émetteur-récepteur (Parkinson, 1993). Le domaine périplasmique est important pour la détection des monosaccharides (Chang et Winans, 1992). TM2 est le domaine kinase : il joue un rôle important dans l'activation de VirA, se phosphorylant lui-même au niveau du résidu His 474 (Huang *et al.*, 1990 ; Jin *et al.*, 1990a) en réponse aux molécules signal provenant des sites de blessure de la plante (Figure 8, étape 3). La détection de monosaccharides par VirA est un système d'amplification important et répond à des niveaux bas de composés phénoliques. L'induction de ce système est seulement possible en présence du sucre (glucose/galactose) périplasmique qui fixe la protéine ChvE (Ankenbauer et Nester, 1990 ; Cangelosi *et al.*, 1990 ) interagissant avec VirA (Shimoda *et al.*, 1990b ; Chang et Winans, 1992).



VirA activée possède la capacité de transférer son phosphate à un résidu Asp, de la protéine VirG. VirG, activée à son tour, se lie au niveau de la région régulatrice des autres opérons *vir*, agissant en tant qu'activateur transcriptionnel (Jin *et al.*, 1990a ; 1990b). La partie C-terminale de cette protéine est responsable de l'activité de fixation à l'ADN, alors que la partie N-terminale est le domaine de phosphorylation. Il possède une homologie avec le domaine récepteur de VirA (Figure 8, étape 4 et 5).

L'activation du système *vir* dépend également de facteurs externes comme la température et le pH. Aux températures supérieures à 32°C, les gènes *vir* ne sont pas exprimés parce qu'il y a changement conformationnel de VirA (Jin *et al.*, 1993), un phénomène qui explique en grande partie les observations relatives à la nature thermosensible de la transformation. (Braun, 1947 ; Tempé *et al.*, 1977).

### 3.2.3. Formation du complexe de transfert du T-DNA

L'activation des gènes *vir* provoque la formation de molécules du T-DNA, simple brin (SB) représentant la copie du brin inférieur du T-DNA, appelé brin-T.

Tout ADN placé entre les séquences frontières du T-DNA sera transféré à la cellule végétale, comme ADN simple brin, et sera intégré dans le génome de la plante. Les frontières et dans certains cas, les séquences « overdrive » sont les seuls éléments agissant en *cis* dans le système de transfert du T-DNA.

Les protéines VirD1 et VirD2 jouent un rôle clef dans cette étape en reconnaissant les séquences frontières du T-DNA et en clivant le brin inférieur à chaque frontière. Les sites de coupure sont utilisés comme sites d'initiation et de terminaison pour la production du brin-T. Après coupure endonucléasique, VirD2 reste attachée de façon covalente à l'extrémité du brin-T. Cette association empêche les attaques exonucléasiques de l'extrémité 5'. Elle distingue cette extrémité 5' comme « extrémité de pilotage » du complexe de transfert du T-DNA.

VirD1 interagit avec la région où le brin-T prend naissance. Des expériences menées *in vitro* ont mis en évidence que la présence de VirD1 est essentielle pour le clivage du substrat superhélioidal d'ADN par VirD2 (Zupan et Zambryski, 1995 ; Christie, 1997). Du point de vue évolutif, ces étapes précoces de formation du brin-T sont reliées à d'autres transferts d'ADN simple brin, qui se produisent durant le processus de conjugaison bactérienne (Lessi *et al.*, 1994 ; Zupan et Zambryski, 1995 ; Christie, 1997 ; voir Tableau 4).

**Tableau 4** : Comparaison des similitudes entre le transfert du T-DNA et le transfert conjugatif du plasmide RP4 (d'après Zupan et Zambrisky, 1995).

Caractéristiques	Analogie proposée entre le transfert du T-DNA et du plasmide RP4	
	T-DNA	RP4
Site d'initiation	Frontière droite	Région de coupure de <i>ori T</i>
Complexe endonucléasique	VirD1/VirD2	TraI, TraJ avec TraH
Intermédiaire de transfert	Complexe-T : Brin-T (simple brin) +VirE2 :	ADN simple brin, pas de protéine fixant l'ADN SB
Polarité du transfert	5' → 3'	5' → 3'
Exportation	Opéron <i>virB</i> VirD4	Opéron <i>tra 2</i> TraG

Une conséquence de ce qui précède est qu'une mutation extensive ou une délétion de la frontière droite du T-DNA conduit à la perte presque totale de la capacité de transfert du T-DNA, alors que pour la frontière gauche il en résulte seulement une baisse de l'efficacité de transfert (Hille *et al.*, 1983). Ceci indique que la synthèse du brin-T commence au niveau de la frontière droite, et progresse dans le sens 5'-3'. Le processus de terminaison se produit même quand la frontière gauche est mutée ou complètement absente, avec cependant une faible efficacité (Filichkin et Gelvin, 1993). La différence peut-être due à la présence d'une séquence enhancer (overdrive) proche de la frontière droite (Peralta et Ream, 1985). Cet overdrive a été trouvé spécialement reconnu par VirC1 (Toro *et al.*, 1989). En accord avec ce qui précède, la délétion de l'opéron *virC* provoque une atténuation de virulence des souches d'*Agrobacterium* (van Haaren *et al.*, 1987 ; Rogowsky *et al.*, 1990).

Ainsi constitué, le brin-T doit traverser de nombreuses membranes et espaces cellulaires avant d'arriver au noyau de la cellule végétale. Donc, pour préserver son intégrité, l'hypothèse que le brin-T « voyageait » vraisemblablement sous forme d'un complexe nucléo-

protéiques appelé complexe-T, a été émise. Cette hypothèse a donné lieu au modèle le plus accepté actuellement (Figure 8, étape 9-A) :

Le complexe brin-T-VirD2 est enveloppé par VirE2, protéine de 60kDa se fixant au SB de façon coopérative. Cette association suggère que le brin-T est complètement enveloppé et donc protégé contre l'attaque des nucléases lors de son transfert vers le noyau de la cellule végétale. De plus, cette association « allonge » le brin-T, réduisant le diamètre du complexe à 2nm, lui permettant ainsi de traverser aisément les canaux membranaires (Zupan *et al.*, 1996). Le complexe-T doit sortir de la bactérie passant à travers les membranes interne et externe ainsi que la paroi bactérienne. Il doit ensuite traverser la paroi et la membrane de la cellule végétale.

On sait que VirE1 est essentielle pour l'exportation de VirE2 vers la cellule végétale, mais elle possède probablement d'autres fonctions non encore caractérisées (Binns *et al.*, 1995). Les souches bactériennes mutées au niveau de *virE1* ne peuvent plus transporter VirE2 qui s'accumule à l'intérieur de la bactérie. De tels mutants peuvent être complétés, si on co-infecte la plante avec une souche qui peut exporter VirE2, indiquant que cette protéine peut être exportée indépendamment de VirE1 et que le transfert de VirE2 en tant que partie du complexe brin-T-VirD2 n'est pas nécessaire (Sundberg *et al.*, 1996). Très récemment il a été montré que le système Vir est en fait capable d'assurer le transfert de protéines non associées à de l'ADN dans la cellule végétale (Vergunst *et al.*, 2000).

A partir de ces données expérimentales, un 2ème modèle a été proposé pour le transfert du brin-T-VirD2 (Figure 8, étape 9-B) :

Ce modèle propose que le complexe transféré soit un ADN SB, dont l'extrémité serait liée de façon covalente à VirD2 mais non enveloppé par VirE2. L'exportation indépendante de VirE2 vers la cellule végétale est présentée comme un processus naturel ; une fois le complexe brin-T «nu»-VirD2 dans la cellule végétale, il serait alors enveloppé par VirE2 (Lessi et Lanka, 1994 ; Binns *et al.*, 1995 ; Zhu *et al.*, 2000).

La protéine VirD4 est également requise pour le transport du brin-T. Sa fonction serait une liaison ATP-dépendante au complexe nécessaire à la translocation du T-DNA (Lin et Kado, 1993 ; Christie, 2001 ; Tableau 2).

VirB sont des protéines qui présentent des caractéristiques similaires à d'autres protéines associées à la membrane (Thompson *et al.*, 1988 ; Ward *et al.*, 1988 ; Kulda *et al.*, 1990 ; Shirasu *et al.*, 1990 ; 1994). La majorité des protéines VirB sont assemblées en un canal de protéines impliquant les 2 membranes (Shirasu et Kado, 1993 ; Shirasu *et al.*, 1994 ; Stephens *et al.*, 1995 ; Das et Xie, 1998 ; Figure 8, étape 7). Des études comparatives ont

montré le haut degré d'homologie entre l'opéron *virB* et la région de transfert des plasmides à large spectre d'hôtes tel que RP4, aussi bien dans leur organisation génétique que fonctionnelle (Lessi *et al.*, 1992 ; Pohlman *et al.*, 1994 ; voir Tableau 4).

En effet les deux systèmes produisent un complexe ADN-protéines non transmissible par lui-même aux cellules hôtes. De plus, ils ont la capacité de transmettre l'ADN de façon « interrègne » (Heinemann et Sprague, 1989 ; Bundock *et al.*, 1995 ; Piers *et al.*, 1996). Le complexe Vir est donc un système de translocation des protéines, dit de type IV. Il a également été montré que la protéine VirE2 et le complexe brinT-VirD2, aussi bien que le plasmide RSF1010, à large spectre d'hôte, peuvent être indépendamment transférés à la cellule végétale *via* le complexe constitué des 11 protéines VirB et de VirD4, lié à la membrane. Le complexe VirB peut aussi assurer le transfert conjugatif de RSF1010 entre bactéries. La présence de RSF1010 dans la souche sauvage, inhiberait le transfert du T-DNA ou de VirE2 aux cellules végétales, faisant penser à une compétition entre l'intermédiaire conjugatif de RSF1010 et le substrat normal du complexe VirB (Binns *et al.*, 1995 ; Stahl *et al.*, 1998). L'utilisation des voies de sécrétion ancestrales reliées aux systèmes de conjugaison dans le but de « livrer » des molécules effectrices aux cellules-cibles d'eucaryotes a été trouvé aussi bien chez les pathogènes de plantes comme *A. tumefaciens*, que de mammifères tels que : *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori* et *Legionella pneumophila*. Chacun de ces systèmes exporte des substrats distincts, essentiellement protéiques pour provoquer une série de changements dans la physiologie de la cellule-hôte durant l'infection. Le transfert d'ADN pourrait n'être qu'une conséquence de son association covalente à des protéines véritables «cibles» du système de sécrétion de type IV. Récemment d'ailleurs, le système de sécrétion de type IV a été décrit comme un « système de conjugaison adapté » (Christie et Vogel, 2000). Ce terme suggère que les systèmes du transfert d'ADN conjugués sont les structures ancestrales à partir desquelles les systèmes de type IV auraient évolué (voir Tableau 5). *Helicobacter pylori*, agent causal de pathologies gastriques, utilise un système semblable pour livrer la protéine Cag de 145Kdal aux cellules de Mammifères. Plusieurs pathogènes intracellulaires (*L. pneumophila*, *Brucella* et *Bartonella*) sont supposés transférer des protéines effectrices incorporées par le macrophage qui aide à leur survie intracellulaire. Le système Ptl de *Bordetella pertussis* responsable de la toux chronique, exporte son substrat, la toxine pertussique, dans le milieu extracellulaire, où s'établit ensuite un contact avec la cellule cible de Mammifères (Christie, 2001). Comme on l'a vu plus haut, le système d'exportation du T-DNA d'*A. tumefaciens* est un système sécrétoire de type IV. Il est donc bien avant tout, un système de sécrétion protéique.

**Tableau 5** : Système de sécrétion de type IV d'*A. tumefaciens* (opéron *virB* et gène *virD4*) et les protéines homologues des plasmides conjugatifs RP4 (P), F et R388 (W) et du système de transfert d'*Helicobacter pylori* et *Bordetella pertussis* (tiré de Christie, 2001).

Protéines Vir d'A. <i>tumefaciens</i>	Propriétés/ fonctions proposées	Protéines apparentées
<b>VirD4</b>	ATPase requise pour l'exportation du brin-T/VirD2 et VirE2, interviendrait dans l'interaction complexeT/complexe VirB.	TraG de RP4 TrwB de R388 TraD de F ORF10 de <i>H. pylori</i>
<b>VirB4</b>	ATPase, autoassemblage, rôle dans l'exportation du substrat.	TraC de F CagE de <i>H. pylori</i>
<b>VirB11</b>	ATPase, autoassemblage, interagit avec d'autres protéines VirB, possible protéine-chaperon / fonction morphologique	TrbB de RP4 HP0525 de <i>H. pylori</i> TrwD de R388
<b>VirB1, B6, B7, B8, B9, B10</b>	constituent le canal de transfert.	ORF169 de F PtII de <i>B. pert.</i> Pont conjugatif de RP4 et de F
<b>VirB1*</b>	VirB1*-VirB9 contribue à la formation du pilus-T ; rôle dans l'attachement.	
<b>VirB2</b>	majeur composant du pilus, rôle dans l'attachement.	TrbC de RP4 TraA, TraN de F
<b>VirB3</b>	stabilisée par VirB4, VirB6	
<b>VirB5</b>	stabilisée par VirB6, possible protéine-chaperon.	

VirB\* : VirB1-résidu73 C-terminal ; P, W : groupe d'incompatibilité des plasmides RP4, et R388, respectivement.

Les 2 opérons accessoires présents chez les plasmides Ti à octopine sont *virF* et *virH*. L'opéron *virF* code une protéine de 23 kDa dont les fonctions semblent être reliées au ciblage (targeting) du complexe T-DNA/protéines vers le noyau mais sa contribution est moins importante (Hooykass et Schilperoort, 1992). L'opéron *virH* est composé de 2 gènes qui codent les protéines VirH1 et VirH2. Ces protéines ne sont pas essentielles mais pourraient activer l'efficacité du transfert en détoxifiant certains composés de la plante susceptibles d'affecter la croissance bactérienne (Kanemoto *et al.*, 1989). Si ceci est la fonction des protéines VirH, elles joueraient donc un rôle dans la spécificité d'hôte des souches bactériennes pour les différentes espèces de plantes (Tableau 2).

Les gènes *virE1* et *virE2* n'ont été trouvés ni sur le plasmide pRiA4 (Aoyama *et al.*, 1989) ni sur pRi1724, alors que ces gènes sont reconnus comme importants dans le transfert du T-DNA chez pTi. L'apparente absence de ces gènes sur les plasmides Ri reste inexplicée jusqu'à présent, bien que les gènes *virE* ne semblent pas essentiels à l'induction racinaire. Aucun gène homologue de *virE* qui complèterait cette fonction n'existe chez *A. rhizogenes* (Moriguchi *et al.*, 2001).

### 3.2.4. Intégration du T-DNA dans le génome nucléaire de la plante

Une fois dans la cellule végétale, le complexe du brin-T est dirigé dans le noyau à travers la membrane nucléaire. A la différence des autres éléments mobiles, comme les transposons ou rétrovirus animaux, le T-DNA ne code aucune protéine impliquée directement dans son intégration. Par conséquent, seules les protéines bactériennes accompagnant le T-DNA dans la cellule végétale hôte et/ou les protéines de l'hôte végétal pourraient aider dans le processus d'intégration.

Les seules protéines bactériennes connues jusqu'à présent qui atteignent la cellule végétale sont VirD2 et VirE2. Elles jouent un rôle important dans cette étape, ainsi que VirF qui, elle a un rôle mineur. De façon remarquable, VirE2 possède 2 signaux de localisation nucléaire de plantes (NLS), et VirD2 en contient un (Bravo Angel *et al.*, 1998). Ceci indique que ces 2 protéines jouent un rôle probable important, une fois que le complexe est dans la cellule végétale en matière d'adressage du complexe vers le noyau de la cellule (Herera-Estrella *et al.*, 1990 ; Shurvinton *et al.*, 1992 ; Rossi *et al.*, 1993 ; Tinland *et al.*, 1995 ; Zupan *et al.*, 1996 ; Zhu *et al.*, 2000 ; Figure 8, étape 10 et 11). En accord avec ce qui précède, la délétion des NLS de l'une des deux protéines réduit mais n'inhibe pas totalement le transfert du brin-T et son intégration dans le génome nucléaire de la plante, suggérant que le ou les NLS de la seconde protéine, non mutée, peut assurer au moins partiellement cette fonction. En sus du rôle des

NLS de VirD2 dans l'adressage du complexe-T vers le noyau, il apparaît que ces protéines sont impliquées dans l'intégration du complexe T dans le matériel génétique végétal. Ainsi la protéine MobA, équivalente à VirD2 et impliquée dans le transfert de plasmide par conjugaison, peut être transférée vers les cellules végétales et permet une intégration du T-DNA dans le génome avec la même efficacité que VirD2 (Buchanan-Wollaston *et al.*, 1987 ; Tinland, 1995). Néanmoins, les principales enzymes responsables de l'intégration du complexe T sont d'origine végétale. Ainsi, deux lignées d'*Arabidopsis* isolées sur la base de leur hypersensibilité aux UV et rayons- $\gamma$ , sont également déficientes en ce qui concerne l'intégration du T-DNA, indiquant que des fonctions liées à la réparation de l'ADN sont impliquées dans le processus d'insertion du T-DNA (Sonti *et al.*, 1995).

Un modèle a été proposé suggérant que l'association entre l'ADN de la plante et le T-DNA est initiée à l'extrémité 3' du brin-T. Cette étape est suivie par la ligation de l'extrémité 5' du brin-T à l'extrémité 3' de l'ADN de plante, par l'intermédiaire du pont phosphotyrosine riche en énergie, qui lie la protéine VirD2 au T-DNA. Ce modèle est représenté Figure 9 (Tinland *et al.*, 1995 ; Tinland, 1996 ; Rossi *et al.*, 1998 ).

Une fois que le T-DNA est intégré de façon covalente à l'ADN nucléaire de la plante une, deux ou plusieurs copies de T-DNA peuvent être trouvées dans le génome nucléaire d'une même cellule végétale. De même, différents T-DNA peuvent être transférés, dans la même cellule végétale, par différentes bactéries (Depicker *et al.*, 1985 ; De Block et Debrouwer, 1991 ; Tinland, 1996).

Les données prises à partir de différentes espèces de plante montrent que le choix des sites d'intégration se fait apparemment au hasard, avec cependant une intégration préférentielle dans les régions en activité transcriptionnelle (Herman *et al.*, 1990 ; Tinland, 1996). Cette intégration n'est pas site spécifique et ne requiert pas de grandes étendues d'homologies mais se fait plutôt par recombinaison illégitime (Gheysen *et al.*, 1991 ; Tinland, 1996 ; Figure 8, étape 12).

### 3.2.5. Expression des gènes du T-DNA

Alors que les gènes du T-DNA sont portés par le plasmide Ti ou Ri d'origine procaryote, ces gènes possèdent des séquences de régulation de type eucaryote. Ils sont exprimés dans les cellules végétales, leurs régions 5' et 3' contiennent des séquences régulatrices d'eucaryotes telles que les boîtes TATA et CAAT et les signaux de polyadénylation. Cependant ces gènes ne contiennent pas d'intron, à l'exception de *rolA* chez *A. rhizogenes* (Magrelli *et al.*, 1994). Leur transcription est dépendante de l'ARN polymérase

II (Willmitzer *et al.*, 1982). Ils sont reconnus par des facteurs de la plante agissant en *trans* et montrent une spécificité tissulaire et des mécanismes de régulation comparables à ceux des plantes.

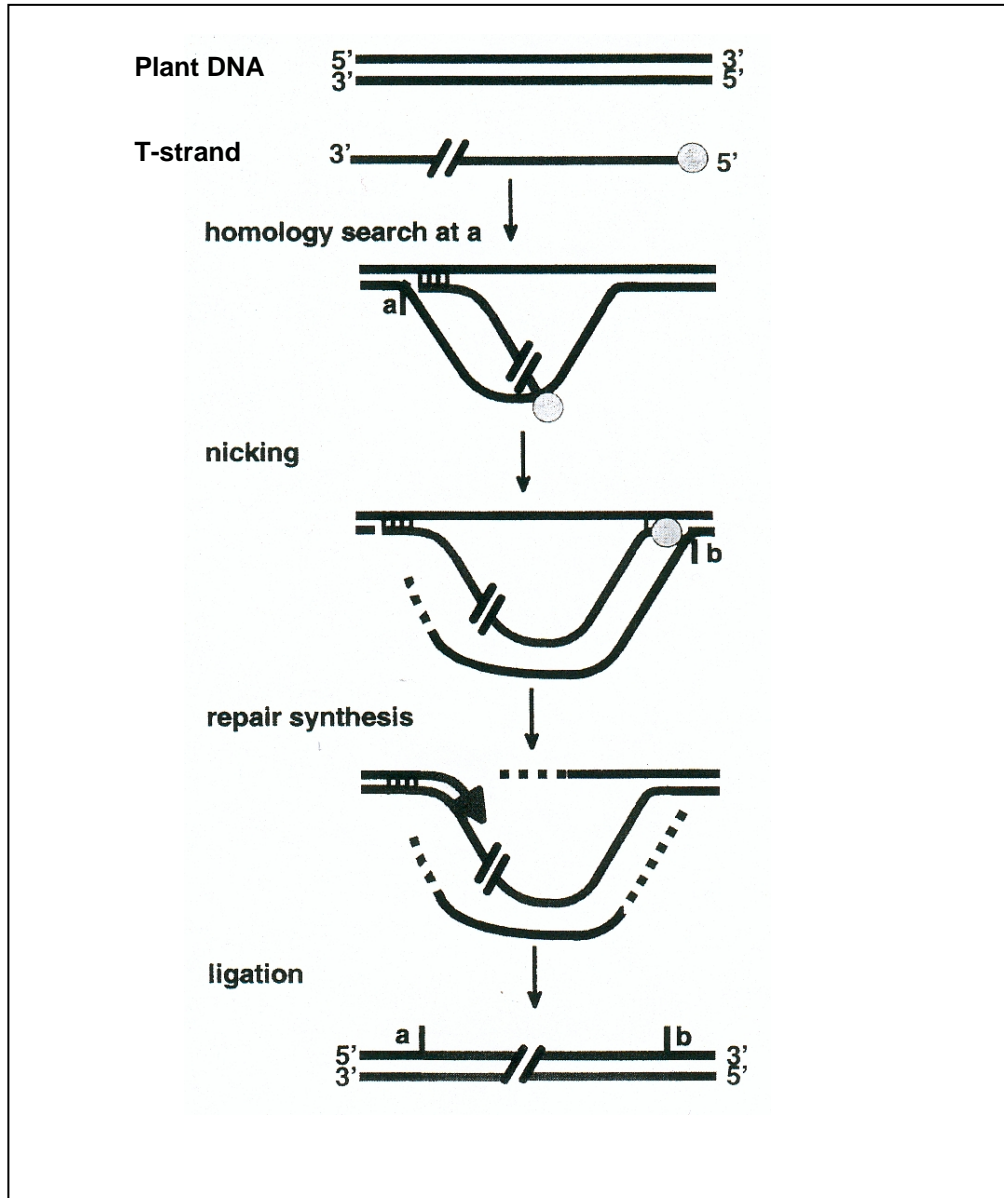
### 3.3. Les opines

#### 3.3.1. Structure

Les opines sont des petites molécules constituées de sucres, d'acides aminés et d'acides cétoniques. Ces constituants sont présents en abondance dans les cellules végétales transformées. Plus d'une vingtaine d'opines sont actuellement connues et identifiées. Leur production dans le crown gall ou le hairy root dépend des plasmides Ri ou Ti hébergés par la bactérie pathogène. (Dessaux *et al.*, 1998). Certaines d'entre elles sont représentées dans le Tableau 6.

#### 3.3.2. Importance dans l'interaction *Agrobacterium*-plante

Le fait que les gènes qui codent les opines soient localisés presque tous, près de la frontière droite du T-DNA et que ces gènes soient transférés les premiers dans la cellule végétale laisse supposer l'importance des opines dans l'interaction *Agrobacterium*-plante (Zambryski *et al.*, 1989). En effet, les opines constituent des médiateurs chimiques clefs dans l'interaction agrobactérie-plantes. Elles constituent des substrats de croissance spécifiques aux agrobactéries pathogènes (Tempé et Goldmann, 1982 ; Dessaux *et al.*, 1998), leur fournissant les sources de carbone, d'azote et d'énergie nécessaires à leur propagation, et contribuent aussi à la dissémination de leur plasmide Ti ou Ri. Ces deux « rôles » des opines sont les fondements du concept d'opine énoncé par Tempé et Petit, (1983) et du concept de colonisation génétique (Schell *et al.*, 1979). La dissémination du pouvoir pathogène est liée au fait que les opines peuvent induire spécifiquement le transfert conjugatif du plasmide Ti (Petit *et al.*, 1978 ; Ellis *et al.*, 1982) et peuvent dans une moindre mesure stimuler l'induction des gènes de virulence (Veluthambi *et al.*, 1989). Aucune des opines connues n'induit le transfert conjugal du plasmide Ri, qui semble donc, jusqu'à présent, se produire de façon constitutive (Petit, non publié).



**Figure 9** : Modèle d'intégration du T-DNA dans le génome végétal (d'après Rossi *et al.*, 1998). Pointillés : ADN digéré ; O : protéine VirD2 à l'extrémité 5' du brin-T. Plant DNA : ADN végétal ; T-strand : brin-T ; homology search at a : recherche de séquence homologue ; nicking : coupure ; repair synthesis : synthèse ; ligation : ligature.

**Tableau 6** : Composition des opines (d'après Winans, 1992).

<b>Famille opinique</b>	<b>Opines</b>	<b>Constituants</b>
<b>octopine</b>	octopine acide octopinique lysopine histopine	arginine + pyruvate ornithine + pyruvate lysine + pyruvate histidine + pyruvate
<b>nopaline</b>	nopaline acide nopalinique	arginine + $\alpha$ -cétoglutarate ornithine + $\alpha$ -cétoglutarate
<b>mannityl opines</b>	mannopine acide mannopinique agropine acide agropinique	glutamine + mannose acide glutamique + mannose lactonisation de la mannopine lactamisation de la mannopine
<b>cucumopine</b>	cucumopine, mikimopine cucumopine lactame mikimopine lactame	histidine + $\alpha$ -cétoglutarate (2 stéréoisomères) lactamisation de la mikimopine ou de la cucumopine
<b>agrocinopine</b>	agrocinopine A agrocinopine B agrocinopine C agrocinopine D	saccharose + arabinose + phosphate fructose + arabinose + phosphate saccharose + glucose + phosphate fructose + glucose + phosphate

Les opines sont classées en familles selon leur structure : exemple famille de la cucumopine. La Figure 10 représente la structure chimique de certaines d'entre elles.

### 3.4. Classification des plasmides

La possession d'un pTi ou Ri permet à une souche d'*Agrobacterium* d'exploiter le métabolisme de la plante hôte après infection. Le type d'opine présent dans les tissus transformés est caractéristique du plasmide pathogène porté par la souche d'*Agrobacterium*. Ceci constitue la base du système de classification utilisée jusqu'à présent des plasmides en fonction de leur type opinique (Dessaux *et al.*, 1992 ; Dessaux *et al.*, 1998) ; voir Tableau 7).

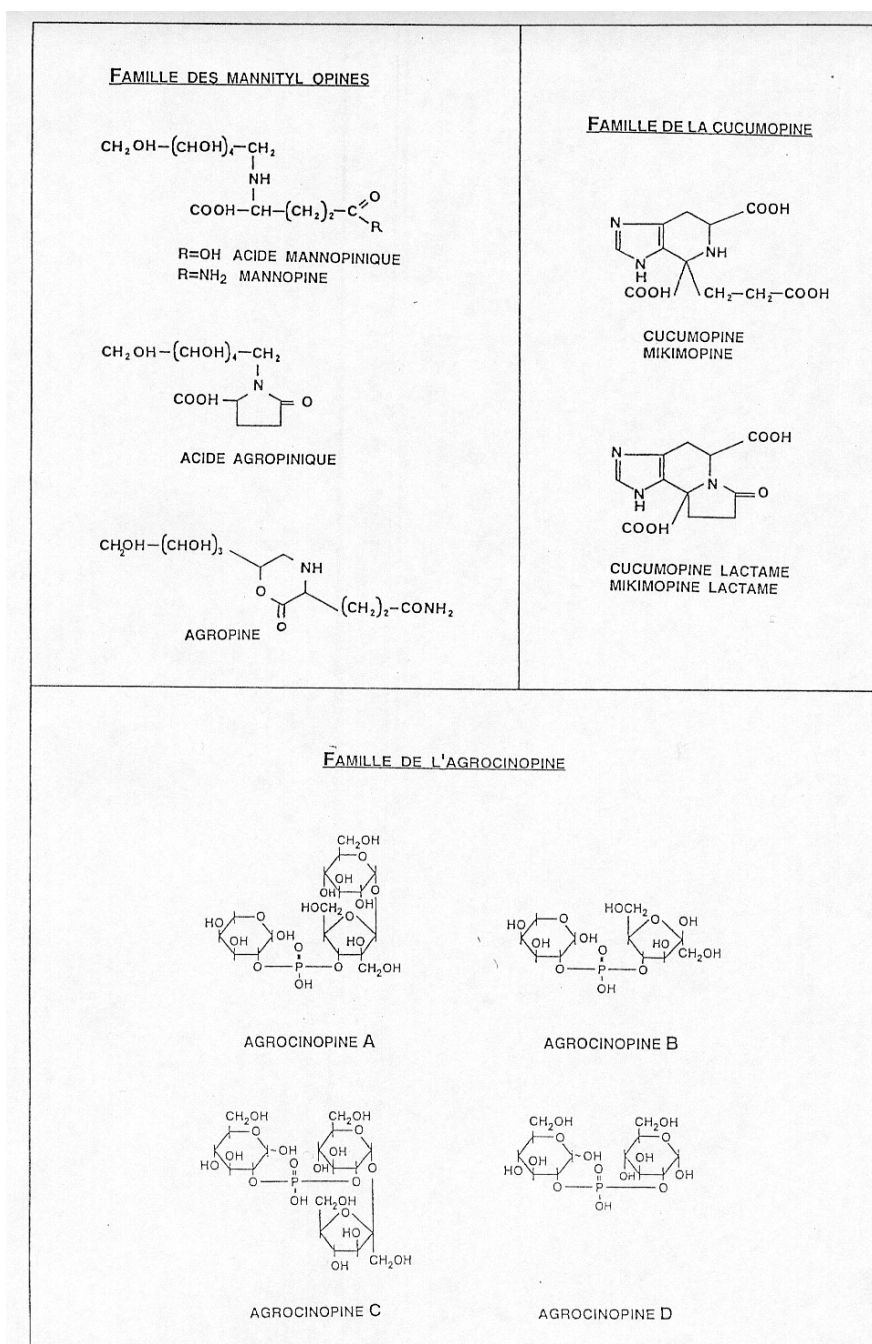


Figure 10 : Structure chimique de quelques opines.

**Tableau 7:** Classification des **plasmides Ti et Ri** (tiré de Dessaux *et al.*, 1992 ; 1998).

<b>Type opinique des plasmides Ti</b>	<b>Opines détectées dans les tumeurs</b>	<b>Souches sauvages représentatives</b>
<b>octopine</b>	octopine, acide octopinique, lysopine, histopine, agropine, mannopine, acides mannopinique et agropinique	A6, B6, Ach5, 15955
<b>agropine</b>	agropine, mannopine, acide mannopinique et agropinique, leucinopine, leucinopine lactame, L,L-succinamopine, agrocinosinesC etD	B0542, AT1, AT281
<b>nopaline</b>	nopaline, acide nopalinique, agrocinosines A et B	T37, C58, H100
<b>succinamopine</b>	D,L-succinamopine, succinamopine lactame, succinopine lactame	Eu6, AT181
<b>Lippia</b>	agrocinosine	AB2/73
<b>GrapevineI</b> <b>GrapevineII</b> <b>GrapevineIII</b>	octopine, cucumopine nopaline vitopine, ridéopine	CFBP 2407, CFBP 2683 CFBP 2179, Ag 28 Sz1, Sz2
<b>chrysopine</b> <b>/succinamopine</b>	chrysopine, déoxy-fructosyl-5-oxoproline (dfop), L,L succinamopine, L,Lleucinopine	ANT4, Chry9, K224, K289
<b>chrysopine /nopaline</b>	chrysopine, déoxy-fructosyl-5-oxoproline (dfop), nopaline	2788, AF1

Type opinique des plasmides Ri	Opines détectées dans les racines	Souches sauvages
<b>agropine</b>	Agropine, mannopine, acides mannopinique et agropinique, agrocinopines A +B	15834, A4, 1855, HRI
<b>mannopine</b>	Mannopine, acides mannopinique et agropinique, agrocinopines C + D	8196, TR7, TR101
<b>cucumopine</b>	Cucumopine, cucumopine lactame	<b>2659</b>
<b>mikimopine</b>	Mikimopine, mikimopine lactame	1724

#### 4- Oncogènes du T-DNA

Les gènes du T-DNA des plasmides Ti et Ri sont appelés « oncogènes » à cause de leur potentiel morphologique remarquable et parce qu'ils interfèrent avec des mécanismes variés de régulation de la division cellulaire (Binns et Costantino, 1998). Par définition, un oncogène est capable par lui-même de causer une transformation néoplasique et de donner l'apparence du phénotype tumoral à la cellule qui le renferme. Chez les animaux, il a été démontré qu'un gène présent dans les cellules normales était l'homologue de l'oncogène viral (Gaudin *et al.*, 1984). Ce gène est appelé proto-oncogène (*c-onc*) et l'oncogène viral correspondant est désigné par *v-onc*.

Chez *A. tumefaciens*, le terme oncogène semble approprié pour les gènes du T-DNA tels que *iaaM* et *iaaH*, *ipt* ou le gène *6b*, capables par eux-mêmes, de causer la formation de structures tumorales (prolifération cellulaire) sur certains hôtes. Cependant, la présence d'homologue cellulaire n'a pas été rapportée pour ces cas (Meyer *et al.*, 2000).

Dans le cas d'*A. rhizogenes*, à l'exception des gènes *aux1* et *aux2* du TR-DNA des souches à agropine (Offringa *et al.*, 1986) et de l'ORF13 (Fründt *et al.*, 1998), aucun gène ne peut causer à lui seul une prolifération cellulaire. Néanmoins, des homologues cellulaires des gènes du T-DNA du plasmide Ri ont été décrits, clonés et analysés (Meyer *et al.*, 1995 ; Meyer *et al.* 2000).

## 4.1. Oncogènes du T-DNA des plasmides Ti

### 4.1.1. Les oncogènes principaux

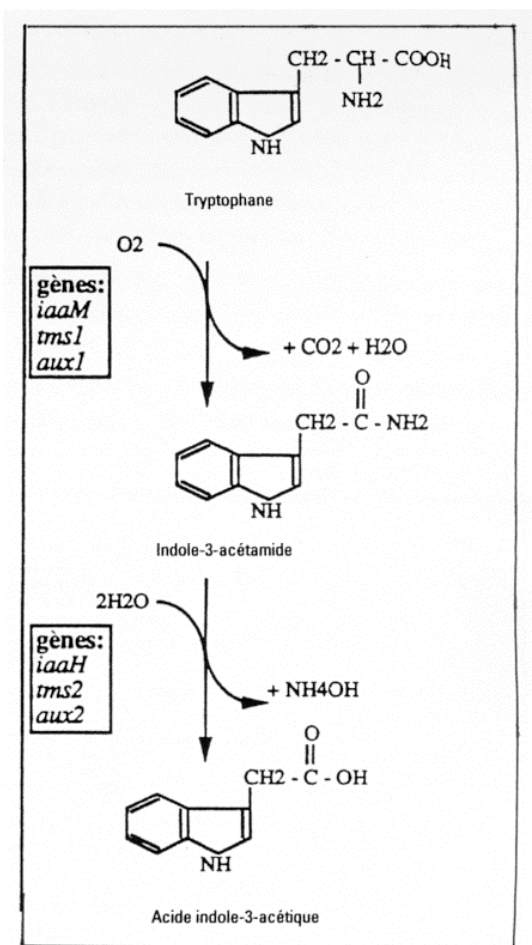
Les plasmides Ti contiennent un ou plusieurs T-DNA différents délimités par des séquences de 25pb en répétition directes mais imparfaites, appelées frontières.

Grâce à des expériences de mutagenèse par insertion et délétion, plusieurs groupes de recherche ont pu identifier avec précision les *loci* qui contrôlent la morphologie de la tumeur (Nester *et al.*, 1984). Un de ces loci, appelé *tms* (tumor morphology « shooty ») produit des tumeurs bourgeonnantes quand il est muté et introduit dans la plante (Garfinkel *et al.*, 1981 ; Oms *et al.*, 1981). Au cours d'expériences analogues, le locus *tmr* (tumor morphology « rooty ») est responsable du phénotype de tumeurs développant des racines, quand il est inactivé. Les phénotypes mutés (« rooty et shooty ») sont les mêmes que ceux produits lorsque des cals croissent dans un milieu contenant des niveaux variables d'hormones de plantes : auxine et cytokinine. Il a donc été proposé que le produit du locus *tms* serait impliqué dans le métabolisme de l'auxine et que celui du locus *tmr* dans le métabolisme de la cytokinine (Garfinkel *et al.*, 1981 ; Oms *et al.*, 1981 ; Leemans *et al.*, 1982 ; Joos *et al.*, 1983). En accord avec ceci, le locus *tms* contient deux gènes (*iaaM* et *iaaH*) codant pour les enzymes impliqués dans une nouvelle voie de biosynthèse de l'AIA (acide indole-3-acétique), auxine majeure endogène des plantes (Inzé *et al.*, 1984).

Le gène *iaaM*, connu aussi sous le nom de gène1, *tms1*, *aux1* ou *shi* (shoot inducing) (Thomashow *et al.*, 1984 ; van Onckelen *et al.*, 1986) code pour une tryptophane-2-monooxygénase qui catalyse la conversion du tryptophane en indole-3-acétamide (IAM), ensuite converti en AIA par le produit du gène *iaaH* (gène2, *tms2*, *aux2* ou *shi*) (Schröder *et al.*, 1984). Cette voie métabolique de la biosynthèse de l'auxine n'existe pas normalement, chez les plantes (pour revue : Gaudin *et al.*, 1994 ; Figure 11)

D'autre part, le locus *tmr* contient un seul gène, le gène *ipt* (gène4, *tmr*, *cyt*, *roi* pour root inducing) code une isopentenyl transférase qui catalyse la synthèse de la cytokynine isopentenyladenosine 5'MP à partir de l'isopentyl-pyrophosphate et 5'AMP. (Akiyoshi *et al.*, 1984 ; Barry *et al.*, 1984 ; Buchmann *et al.*, 1985 ; Figure 12).

On retrouve ces oncogènes chez d'autres espèces bactériennes phytopathogènes comme *Pseudomonas savastanoi* (*iaaM*, *iaaH*), *Bradyrhizobium* (*iaaH*) (Yamada *et al.*, 1985 ; Gaudin *et al.*, 1994) ou *Rhodococcus fasciens* (*ipt*), une bactérie gram positif (Crespi *et al.*, 1992).



**Figure 11 :** Voie de biosynthèse de l'acide indole-3-acétique (AIA) dans les cellules végétales transformées par *A. tumefaciens* ou *A. rhizogenes*.

Dans le cas d'*Agrobacterium tumefaciens*, l'expression de ces deux catégories de gènes conduit à une surproduction d'AIA et de cytokinine qui, en coopération avec d'autres gènes du T-DNA (voir paragraphe suivant) tel que le gène *ila* (Körber *et al.*, 1991) ou le gène *6b* (Hooykaas *et al.*, 1988 ; Wabiko et Minemura, 1996), provoque une désorganisation de la signalisation cellulaire, produisant sa multiplication anarchique et la formation de la tumeur de la galle du collet.

#### 4.1.2. Les autres différents oncogènes

En plus des gènes *tms1* *tms2* et *ipt* décrits précédemment, on peut citer :

Le gène *ila* (gène 5) : le produit de ce gène peut convertir le tryptophane en ILA (indole-3-lactate), un analogue de l'auxine ((Körber *et al.*, 1991 ; Sprunck *et al.*, 1995). L'expression du gène *ila* est induite par l'auxine et réprimée par de hauts niveaux de cytokinine (Koncz et Schell, 1986). Son expression est plus forte dans les cals et les tiges que dans les feuilles. Le

gène est exprimé à tous les stades du développement embryonnaire de carottes (Gaudin *et al.*, 1994 ; Figure12).

Le gène 6b , trouvé chez les plasmides à octopine et nopaline est considéré comme oncogène puisque sa présence peut suffire à induire des tumeurs sur des plantes comme le Kalanchoé, *Nicotiana rustica*, *N.glauca*, et les vignes (Hookyaas *et al.*, 1988 ; Tinland *et al* ; 1990 ; Wabiko et Minemura, 1996). Le produit de ce gène réduit l'activité des cytokinines et augmente la sensibilité aux auxines (Gaudin *et al.*, 1994 ; Figure 12).

Le gène 3' du TR-DNA du plasmide Ti de la souche Ach5 ou du T-DNA de AB4 induit de petites tumeurs sur le *Kalanchoé tubiflora* mais ne semble pas avoir d'effets sur les autres hôtes (Barker *et al.*, 1983).

Le gène e : selon les espèces de plantes testées (tomate, tournesol ou Kalanchoé), les souches d'*Agrobacterium* portant des mutations dans le gène *e* induisent seulement des petites ou presque pas de tumeurs détectables de crown gall. D'après les études mutationnelles par insertion de Tn5 et les homologies de protéines observées, le produit du gène *e* semble être impliqué dans la formation de tumeur (Broer *et al.*, 1995).

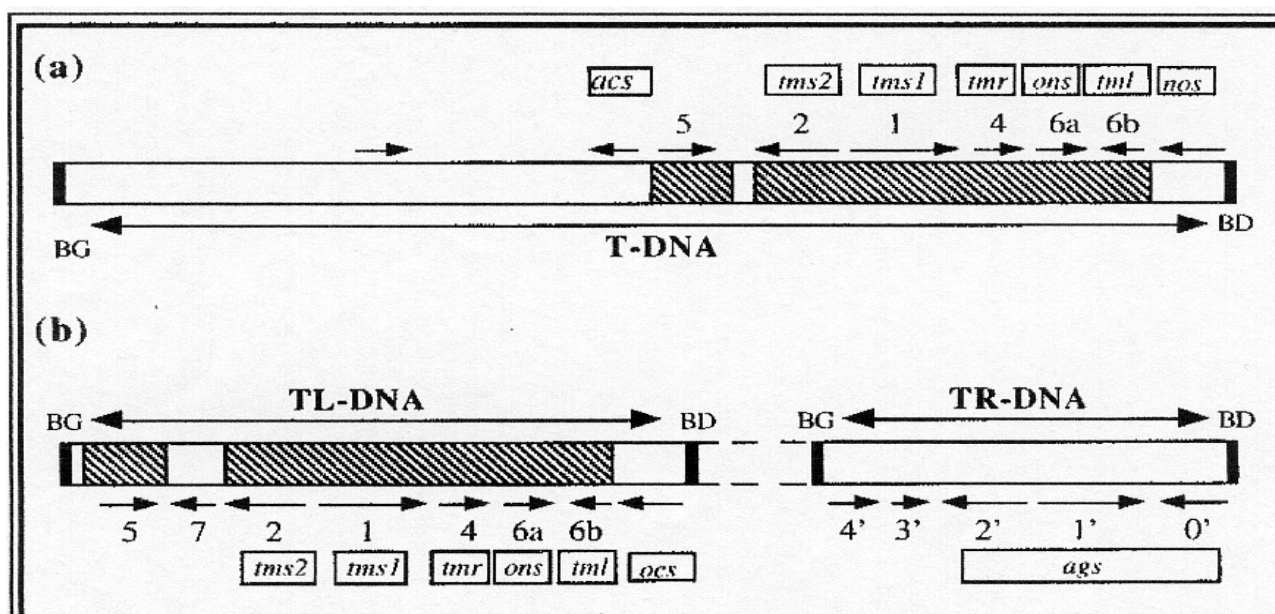
Le gène Lso de la souche AB2/73 (Lippia strain oncogène), induit des cals indifférenciés sans l'aide d'autres oncogènes du T-DNA (Otten et Schmidt, 1998).

## 4.2. Oncogènes du T-DNA des plasmides Ri

### 4.2.1. Structure du T-DNA

Comme les plasmides Ti, les plasmides *d'A. rhizogenes* peuvent porter un ou plusieurs T-DNA différents. Le plasmide le mieux étudié jusqu'à présent, est le pRiA4 de la souche à agropine qui peut transférer les 2 T-DNA appelés TL-DNA et TR-DNA pour partie gauche (Left) et droite (Right) de l'ADN du T-DNA, respectivement, à la cellule végétale (White *et al.*, 1985 ; Figure 13).

Les études des gènes individuels font référence au plasmide à agropine. Le nom des gènes et des ORFs sont, pour tous les plasmides, basés sur les homologies de séquences avec le T-DNA entièrement séquencé du pRiA4 : par exemple ORF11 de pRi2659 est dénommé *rolB* à cause de sa position colinéaire sur le T-DNA et son homologie avec l'ORF11 du pRiA4.



**Figure 12 :** Carte fonctionnelle du T-DNA du pTiC58 à nopaline (a) et du pTiAch5 à octopine (b) (d'après Joos *et al.*, 1983 ; Salomon *et al.*, 1984).

Les parties hachurées représentent les régions homologues. Les flèches indiquent le sens de transcription des différents gènes. BD : bordure droite ; BG : bordure gauche.

Depuis peu, la séquence du T-DNA de pRi2659 est connue (GenBank, accession : AJ271050, 2000) ainsi que la séquence complète du pRi1724 à mikimopine (Moriguchi *et al.*, 2001). A l'instar du pRi2659 à cucumopine (Failla *et al.*, 1990 ; Serino *et al.*, 1994) et du pRi8196 à mannopine (Hansen *et al.*, 1991), le plasmide pRi1724 (Kiyokawa *et al.*, 1994 ; Tanaka *et al.*, 1994) transfère un seul fragment d'ADN dans les cellules de plantes infectées.

#### 4.2.1.1. TR-DNA

Le TR-DNA est trouvé seulement sur les pRi à agropine. Ce fragment d'ADN présente une homologie significative avec le T-DNA d'*A. tumefaciens* alors que le TL-DNA des pRi est complètement différent du T-DNA des pTi. Le TR-DNA contient 2 gènes impliqués dans la biosynthèse de l'auxine les gènes *iaaM* et *iaaH*, ainsi que des gènes qui codent les opines : mannopine (*mas1'* et *mas2'*) et agropine (*ags*) (Camilleri et Jouanin, 1991 ; Figure 13). A cause de son homologie avec les loci *iaaM* et *iaaH*, on a cru d'abord que le TR-DNA jouait un rôle central dans l'induction du hairy root.

Le TR-DNA contient aussi un ORF présentant une grande homologie avec un locus du TL-DNA, très étudié, dit locus *rolB* (Boucher et Camilleri, 1990). En dépit de son homologie,

ce gène appelé *rolB* TR, produit des effets morphologiques dans les plantes transgéniques différents de ceux de *rolB* TL (Lemcke et Schmülling, 1998a ; voir aussi § 4. 2.2.2.).

Le TR-DNA ne présente pas d'homologie véritable avec le seul T-DNA des autres plasmides Ri. A partir de ces données et puisque le TR-DNA n'existe que chez les pRi à agropine, ce fragment d'ADN et ses gènes *aux* ne semblent pas être essentiels dans l'induction du hairy root. Il pourrait cependant jouer un rôle dans la spécificité d'hôtes et/ou de tissus en déterminant le type de réponse néoplasique ; il pourrait aussi avoir un rôle dans la régulation des gènes du TL-DNA (pour revue : Meyer *et al.*, 2000).

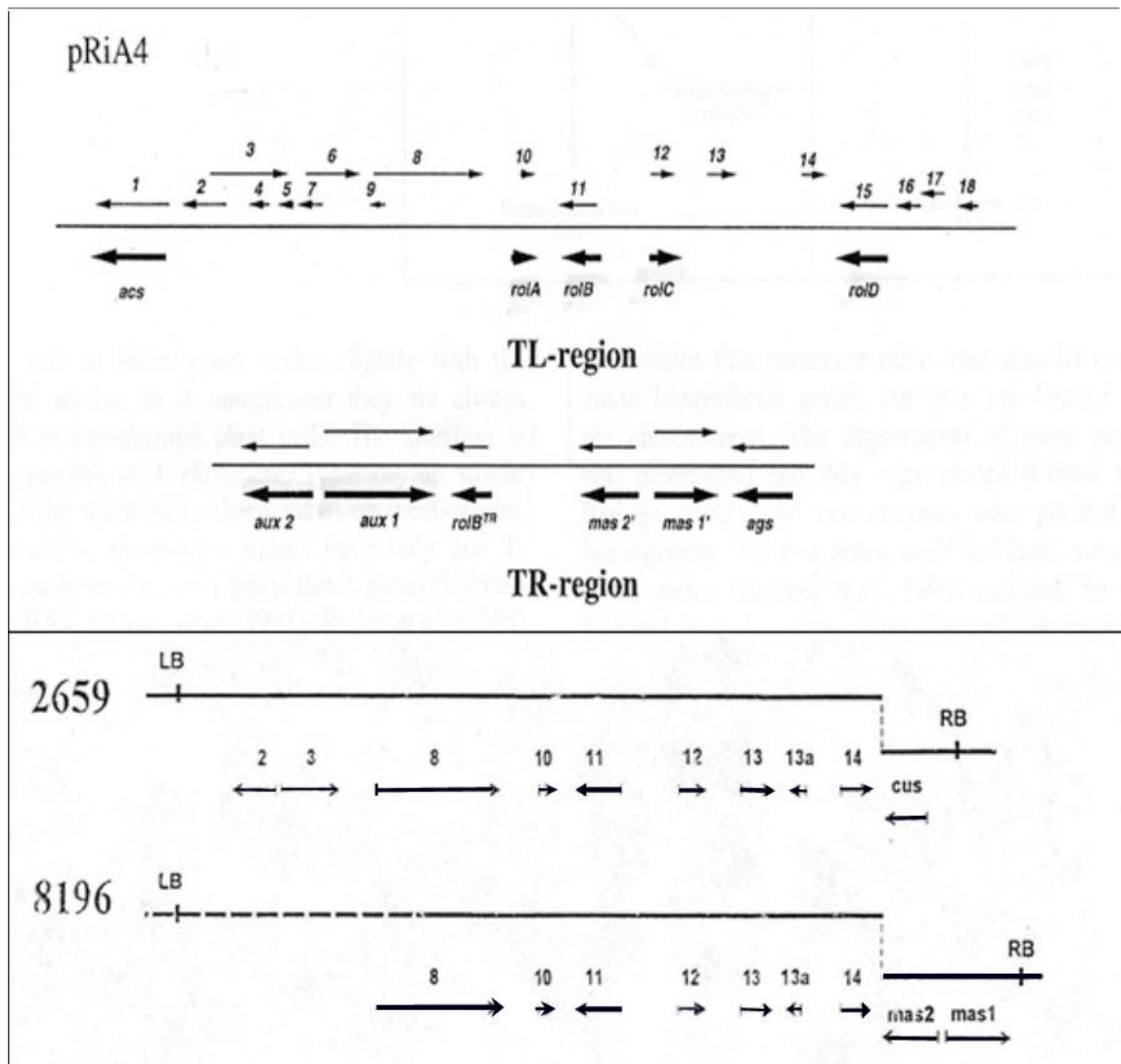
#### 4.2.1.2. TL-DNA

L'analyse des séquences du TL-DNA des souches à agropine a révélé la présence de 18 ORFs (Slightom *et al.*, 1986). Pour la plupart d'entre eux des transcripts ont été mis en évidence (Durand-Tardif *et al.*, 1985 ; Taylor *et al.*, 1985 ; Ooms *et al.*, 1986). White *et al.* (1985) ont réalisé une analyse fonctionnelle du TL-DNA d'*A. rhizogenes* A4 par mutagenèse insertionnelle de Tn5 et infection consécutive sur des feuilles et tiges de Kalanchoé. Ils ont montré que seuls 4 *loci* affectaient la morphologie des racines produites. Ces *loci* appelés *rol* (root loci) A, B, C et D coïncidaient avec les ORF10, 11, 12 et 15 respectivement (Slightom *et al.*, 1986 ; voir Figure 13). Les séquences codantes des gènes *rol* ne correspondent à aucune séquence connue (Gaudin *et al.*, 1994).

L'analyse génétique a montré qu'un fragment du T-DNA comprenant seulement les gènes *rolA*, B et C provoquait l'induction de racines néoplasiques, chez l'ensemble des plasmides Ri (Capone *et al.*, 1989a ; Sérino *et al.*, 1994 ; Kiyokawa *et al.*, 1994). Parmi les gènes *rol*, seul *rolB* est capable d'induire des racines chez presque toutes les plantes testées : disques de carotte (Capone *et al.*, 1989a ; 1989b), tiges de tabac (Cardarelli *et al.*, 1987), feuilles de tabac et feuilles de Kalanchoé (Spena *et al.*, 1987).

Au contraire *rolA* et *rolC* sont capables d'induire une croissance limitée des racines sur des feuilles de tabac et aucune racine n'est induite suite à une infection par *rolD* au niveau de tiges de tabac (Mauro *et al.*, 1996) ou de disques de feuilles de tabac (Lemcke et Schmülling, 1998b).

En sus, certaines différences fonctionnelles existent entre les gènes *rol* des différents plasmides Ri. Nous citerons le cas des gènes *rolA* et B de pRi2659, capables d'induire les racines sur disques de carottes sans addition d'auxine. Cependant, dans le cas de *rolA*, une augmentation d'incidence racinaire est observée lorsque les gènes *aux* du TR-DNA de pRi1855 sont également présents. (Sérino *et al.*, 1994). De plus le T-DNA des plasmides pRi2659,



**Figure 13** : Organisation fonctionnelle du T-DNA de pRiA4 à agropine et de pRi2659 à cucumopine et de pRi8196 à mannopine (Gaudin *et al.*, 1994; Brevet *et al.*, non publié).

pRi8196 et pRi1724 ne possède pas de gène *rolD* (Brevet et Tempé, 1988 ; GenBank, accession AJ271050, 2000 ; Moriguchi *et al.*, 2001 ; Figure 13).

#### 4.2.2. Les différents oncogènes

Les gènes et les mécanismes intervenant dans la genèse du syndrome du hairy root semblent être très subtils, impliquant des interactions entre les gènes du T-DNA et d'éventuels facteurs de l'hôte. Ils sont beaucoup plus complexes que ceux qui régissent la formation de la tumeur de crown-gall.

Si l'expression des 3 gènes *rolA*, B et C est suffisante pour induire ce syndrome, d'autres gènes du T-DNA peuvent intervenir dans cette induction racinaire. Pour dissocier leurs effets et décrire le rôle de chacun d'eux dans le syndrome complexe du hairy root, ceux-ci ont été introduits seuls, ou en combinaison, dans des plantes telles que le tabac ou la pomme de terre. Les effets et les caractéristiques phénotypiques de chacun ont été résumés dans le Tableau 8. Chacun de ces gènes montre un profil d'expression spécifique et différents types de régulation (Tableau 9). Le Tableau 10 donne le rôle proposé pour chacun d'entre eux d'après les revues suivantes : Gaudin *et al.*, 1994 ; Nilsson et Olsson, 1997 ; Binns et Costantino, 1998 ; Meyer *et al.*, 2000.

Dans les paragraphes suivants, nous décrirons surtout la particularité de ces oncogènes, en insistant sur le gène *rolB*, qui, du fait de son rôle central a été le plus étudié et l'ORF8 qui fait l'objet de cette étude.

**Tableau 8** : Phénotypes des plantes transgéniques ; ces plantes ont été obtenues par introduction de gène(s) *rol* et des autres gènes sous le contrôle de leur promoteur (p) ou sous le contrôle du promoteur 35S (essentiellement d'après Gaudin *et al.*, 1994).

Plantes transgéniques	Caractéristiques phénotypiques
<b>p-rolA +p-rolB + p-rolC</b>	-syndrome du hairy root : dominance apicale réduite, feuilles gaufrées et épinastiques, distance internodale réduite, production de graines réduite, fleurs petites (Jouanin <i>et al.</i> , 1987 ; Spina <i>et al.</i> , 1987 ; Schmülling <i>et al.</i> , 1988 ; Sérino <i>et al.</i> , 1994 ; Kiyakawa <i>et al.</i> , 1994).



<b>p-ORF13</b>	-phénotype normal (Hansen <i>et al.</i> , 1993; Lemcke et Schmülling 1998b).
<b>35S-ORF13</b>	-longueur internodale réduite, feuilles ovales vert sombre et gaufrées, inhibition de la croissance des racines, fleurs petites, production de graines réduite (Hansen <i>et al.</i> , 1993 ; Lemcke et Schmülling 1998b). -développement de cals vert sombre sur disques de carotte (Fründt <i>et al.</i> , 1998).
<b>ORF14</b>	-phénotype normal (Hansen <i>et al.</i> , 1993 ; Lemcke et Schmülling 1998b).
<b>ORF3</b>	-nécrose au niveau de l'extrémité des feuilles, des bractées et des sépales (Lemcke et Schmülling, 1998b).
<b>p-ORF8</b>	-phénotype normal (Lemcke et Schmülling, 1998b ; ce travail).
<b>35S-ORF8</b>	-phénotype normal (Lemcke et Schmülling, 1998b). -forme des cotylédons altérée (ce travail). -grains d'amidon nombreux au niveau des cotylédons et des feuilles (ce travail).
<b>2x35S-A4-*NORF8</b>	-plantes naines ; feuilles tachetées avec accumulation de saccharose et d'amidon (Otten et Helfer, 2001).

\*NORF8 : domaine N-terminal de l'ORF8 de pRiA4.

#### 4.2.2.1. *rol A*

Les plantes exprimant le gène *rolA* sous le contrôle de son propre promoteur montrent un phénotype altéré comme décrit dans le Tableau 8. (Tepfer, 1984; Vilaine *et al.*, 1987, van Altvorst *et al.*, 1992). Lorsque ce gène est placé sous le contrôle du 35SCaMV (promoteur 35S du Virus de la Mosaïque du chou-fleur) ce phénotype est plus accentué (Sinkar *et al.*, 1988 ; Schmülling *et al.*, 1988).

##### -relation avec les hormones :

Les mesures d'hormones dans les tissus des plantes transgéniques *rolA* montrent une altération de la quantité d'acide gibbéréllique (GA) (Schmülling *et al.*, 1993 ; Dehio *et al.*, 1993 ; Moritz et Schmülling, 1998). D'autre part, des protoplastes de mésophylle de feuilles de tabac exprimant *rolA* présentent une sensibilité accrue à l'auxine (Maurel *et al.*, 1991).

-transcription :

Des transcripts de 650 à 800 bases ont été assignés à *rolA* (Taylor *et al.*, 1985 ; Spena *et al.*, 1987 ; Schmülling *et al.*, 1988 ; Sinkar *et al.*, 1988), incluant une queue poly A variable .

Un intron de 73 à 76 nucléotides a été trouvé dans le pré-ARN du gène *rolA* (Magrelli *et al.*, 1994). Ces auteurs ont montré que l'épissage du pré-ARN messager se produisait dans la cellule végétale. Depuis peu l'intron de *rolA* a été identifié comme promoteur procaryote (Pandolfini *et al.*, 2000).

-expression :

L'expression de *rolA* montre un profil tissu-spécifique fort dans les tiges et plus faible dans les racines et les feuilles (Tableau 9).

-régulation :

Le promoteur du gène *rolA* est constitué de 3 domaines A, B et C qui contrôlent l'expression du phénotype et de la spécificité d'organe (Carneiro et Vilaine, 1993). Les domaines B et C sont nécessaires pour le phénotype caractéristique de *rolA*, alors que le domaine B seul semble être spécifique des feuilles gaufrées. Les plantes exprimant *rolA* ayant le domaine C seul, ont des feuilles lisses mais gardent des internoeuds courts (Carneiro et Vilaine, 1993).

-rôle :

La protéine RolA ayant un PHi basique pourrait être un facteur potentiel de transcription (Levesque *et al.*, 1988 ; Tableau 10). Elle contient des éléments SPXX, fréquents dans les protéines régulatrices qui se fixent à l'ADN (Suzuki, 1989b). Elle possède également une extension d'acides aminés basiques qui pourrait bien servir de signal de localisation nucléaire (NLS) (Raikhel, 1992 ; Hicks *et al.*, 1995). Il est donc, concevable de penser que la protéine RolA serait un facteur transcriptionnel, les gènes cibles seraient *rolA* lui-même, et d'autres gènes possibles parmi lesquels les gènes qui sont impliqués dans la synthèse de l'acide gibbéréllique (Meyer *et al.*, 2000 ; Tableau 10).

#### **4.2.2.2. *rol B***

-phénotype :

Les plantes exprimant *rolB* sous son propre promoteur montrent une formation abondante de racines adventives le long de la tige et une morphologie modifiée de la feuille (Cardarelli *et al.*, 1987 ; Schmülling *et al.*, 1988). Les plantes transformées, exprimant *rolB* sous le contrôle du promoteur 35S, montrent des racines adventives très réduites par rapport aux plantes exprimant *rolB* sous le contrôle de son propre promoteur (Schmülling *et al.*, 1988). De plus, ces plantes possèdent des feuilles nécrosées présentant des altérations de la forme (Tableau 8).

Les cals dérivant de ces plantes forment des pousses seulement après addition de fortes concentrations de cytokinine et se nécrosent rapidement lorsqu'ils sont traités avec de l'auxine (Schmülling *et al.*, 1988 ; Dehio et Schell, 1994).

-expression :

Les ARNm ont été principalement détectés dans les tiges. Les analyses d'expression du gène codant la  $\beta$ -glucuronidase (GUS) placée sous le contrôle du promoteur *rolB* indiquent que l'activité de la  $\beta$ -glucuronidase est surtout détectée au niveau de la tige alors que cette activité est faible dans les racines et les jeunes feuilles (Schmülling *et al.*, 1989). Les analyses de cellules et tissus spécifiques démontrent que l'expression de *rolB* se trouve dans les cellules parenchymateuses du phloème, dans les méristèmes des racines, tiges, pousses et fleurs (Altamura *et al.*, 1991 ; Capone *et al.*, 1991 ; Nilsson *et al.*, 1997 ; Tableau 9).

-relation avec les hormones :

Les racines issues du hairy root présentent une grande sensibilité à l'auxine par rapport aux racines normales (Spano *et al.*, 1988 ; Shen *et al.*, 1988 ; 1990). Ainsi, différents auteurs ont suggéré que les effets de *rolB* pourraient être liés à l'auxine et à la signalisation qu'elle exerce. En accord avec cela, la présence de cette hormone est nécessaire pour qu'il y ait formation de hairy root sur des carottes où le gène *rolB* seul ne peut induire les racines (Cardarelli *et al.*, 1987 ; Capone *et al.*, 1989b). On a d'abord pensé que le gène *rolB* était responsable de la synthèse ou de l'accumulation d'une molécule qui aurait des effets analogue à l'auxine. En effet, une activité enzymatique  $\beta$ -glucosidase a été attribuée à la protéine RolB, dont le substrat est l'indoxyl-glucoside de structure similaire à l'acide indole-3-acétique-glucoside (un dérivé naturel de l'AIA) (Estruch *et al.*, 1991a). Cette activité  $\beta$ -glucosidase suggère que RolB pourrait élever le niveau de l'auxine en libérant l'auxine active à partir de ses formes conjuguées (Estruch *et al.*, 1991b). Cependant, il a été montré que les concentrations d'auxine des tissus exprimant *rolB* n'étaient pas plus élevées que ceux des tissus sains et que le métabolisme de l'auxine ainsi que le « turn-over » de ses conjugués dans ces tissus étaient « normaux ». (Nilsson *et al.*, 1993b ; Schmülling *et al.*, 1993 ; Delbarre *et al.*, 1994).

Auparavant, Maurel *et al.*, (1991) avaient montré que l'induction du potentiel électrique transmembranaire nécessitait des concentrations d'auxine plus faible (3 à 5 ordres) chez les protoplastes exprimant *rolB*, par rapport aux protoplastes non transformés (Maurel *et al.*, 1991). Le gène *rolB* induisait donc, des changements dans la perception de l'auxine, impliquant un grand nombre de molécules de reconnaissance (et/ou affinité) de l'auxine.

Plus récemment, une activité tyrosine phosphatase a été trouvée dans les extraits d'*E.coli* exprimant *rolB* (Fillipini *et al.* 1996). La protéine RolB porte dans sa séquence

d'acides aminés un motif présent chez la superfamille de tyrosine-phosphatase (Lemcke et Schmülling, 1998b) d'où l'idée que *rolB* interfère avec une cascade de kinase-phosphatase dans la voie de transduction de l'auxine, proposée par ces auteurs. La localisation subcellulaire de la protéine RolB dans la fraction de la membrane plasmique est en accord avec l'idée que RolB agit à proximité des molécules de reconnaissance de l'auxine (Meyer *et al.* 2000).

-régulation :

L'auxine joue un rôle important dans la régulation de l'expression de *rolB*. Dans les protoplastes de feuilles fraîchement préparées à partir de plantes transgéniques, *rolB* est exprimé à un niveau très bas. L'incubation pendant 24h avec l'auxine, donne une induction 15 à 20 fois plus élevée, avec une augmentation détectable après 5h. (Maurel *et al.*, 1990 ; Capone *et al.*, 1991). Ainsi, le promoteur *rolB* est activé par l'auxine selon une cinétique plutôt lente (Maurel *et al.*, 1994).

Plusieurs domaines de A à E, ont été identifiés dans la région promotrice (environ 1200pb) de *rolB*. Diverses combinaisons de ces domaines dirigent l'expression du gène dans les différentes populations de cellules du méristème de plantes. De façon remarquable, une délétion du domaine B (-306 à -341), supprime l'expression dans toutes les cellules méristématiques, et supprime également la sensibilité à l'auxine (Capone *et al.*, 1994).

Le promoteur de *rolB* est d'ailleurs, vraisemblablement, une mosaïque de séquences régulatrices de plantes qui est contrôlée par des protéines régulatrices endogènes de plantes (Binns et Costantino, 1998). Ainsi, un facteur de régulation d'origine végétale, appartenant à un nouveau type de protéine qui porte un seul « doigt à zinc » a été identifié (De Paolis *et al.*, 1996). Ce facteur de la famille Dof du Tabac, NtBBF1 (*Nicotiana tabacum* RolB domain B factor) est capable de se lier au domaine B du promoteur *rolB*. Le motif ACTTTA, séquence cible de la protéine NtBBF1, est l'un des éléments *cis*-régulateurs impliqué dans l'induction de *rolB* par l'auxine (Baumann *et al.*, 1999). L'induction de *rolB* par l'auxine a été attribuée à ce facteur de transcription (Binns et Costantino, 1998 ; Baumann *et al.*, 1999).

D'autres travaux ont montré que les oligogalacturonides (OG), connus comme antagonistes de certains effets induits par l'auxine, inhibent la rhizogénèse induite par *rolB* (Bellincampi *et al.*, 1996). Les auteurs indiquent que cette inhibition par les OG s'exerce très tôt sur les effets auxine et non dans les dernières étapes de la rhizogénèse. Ce qui signifie que *rolB* jouerait un rôle dans l'initiation de la rhizogénèse et que ce rôle serait limité aux stades très précoces de ce processus. Ceci est en accord avec le fait que *rolB* stimule la formation du méristème (Meyer *et al.*, 2000).

-rôle :

Le gène *rolB* joue un rôle dans l'initiation des méristèmes. Il stimule la formation de nouveaux méristèmes qui donnent naissance aux différents organes (racines, pousses et fleurs) en fonction des conditions hormonales (Altamura *et al.*, 1994). Ce qui fait dire qu'il agit « comme un gène qui induit les méristèmes » (Binns et Costantino, 1998 ; Tableau 10).

**4.2.2.3. *rol C***

Le phénotype des plantes transgéniques exprimant *rolC*, régulé par son propre promoteur, est décrit dans le tableau 8. Les effets produits sont beaucoup plus prononcés lorsque *rolC* est sous le contrôle du promoteur 35S (Tableau 8).

-relation avec les hormones :

Les effets du gène *rolC* semblent être liés à la signalisation par les cytokinines. La protéine RolC est capable *in vitro* de cliver les formes glucosides de la cytokinine inactive grâce à une activité  $\beta$ -glycolytique, libérant ainsi une cytokinine active (Estruch *et al.*, 1991b).

Selon les méthodes utilisées et les tissus analysés, les mesures d'hormones dans les cellules exprimant *rolC* produisent des résultats qui sont contradictoires. Certains résultats montrent que des niveaux de cytokinine isopentyl adénine sont augmentés (Spena *et al.*, 1989 ; Estruch *et al.*, 1991b ; Schmülling *et al.*, 1993), contrairement à d'autres qui donnent des niveaux décroissants de cytokinine (Nilsson *et al.*, 1993a). Cependant, l'utilisation d'un construit *rolC* Tc inductible a permis de montrer que l'expression de *rolC* sous induction, conduisait à des niveaux de cytokinine-O-glucosides et de cytokinine libre intracellulaires inchangés (Faiss *et al.*, 1996), ou mineurs. Ces variations du niveau de cytokinine restent mineures comparées aux changements induits dans les cellules exprimant le gène *ipt* d'*A. tumefaciens* (Medford *et al.*, 1989).

Les analyses phénotypiques, aussi bien que les mesures d'hormones dans les croisements génétiques entre les plantes exprimant *rolC* et *ipt* indiquent que ces 2 gènes ont des effets distincts (Faiss *et al.*, 1996). De plus, la protéine RolC a été localisée dans le cytoplasme (Estruch *et al.*, 1991c ; Oono *et al.*, 1991) alors que les O-glucosides des cytokinines s'accumulent dans la vacuole (Fusseder et Ziegler, 1988). Ceci permet de déduire que l'activité de RolC n'est pas liée à la libération de cytokinine libre à partir de glucosides dans les cellules végétales (Faiss *et al.*, 1996).

-régulation :

L'analyse de la transcription de *rolC* révèle un profil de régulation complexe (voir Tableau 9).

-rôle :

Le saccharose est un inducteur fort du promoteur *rolC* (Yokoyama *et al.*, 1994 ; Nilsson *et al.*, 1996). Ceci a conduit à proposer que *rolC* pouvait être impliqué dans la régulation du transport et du métabolisme du saccharose (Nilsson et Olsson, 1997). Sachant que le saccharose est connu pour promouvoir la division cellulaire, le gène *rolC* peut avoir une fonction dans les étapes très précoces de la rhizogénèse (Meyer *et al.*, 2000) ; Tableau 10).

**4.2.2.4. *rolD***

Le gène *rolD* et les phénotypes liés à ce gène présentent des caractéristiques particulières. D'une part, *rolD* n'est présent que chez les plasmides Ri à agropine, d'autre part c'est le seul gène *rol* incapable de provoquer la formation de racines (Mauro *et al.*, 1996). De plus, contrairement aux autres gènes *rol*, *rolD* montre une expression tissus ou organes spécifiques assez faible et a plutôt un profil d'expression dépendant du stade de développement de la plante (voir Tableau 9).

-expression

L'expression de *rolD* est élevée chez les jeunes feuilles et les racines, mais reste très basse dans les organes matures (Leach et Aoyagi, 1991). Des analyses histochimiques de plantes transgéniques contenant la fusion promoteur-*rolD*-GUS ont montré que cette expression dépendait du stade de développement, c'est-à-dire de la phase d'expansion et d'élongation pour un organe donné, plutôt que l'organe lui-même (Trovato *et al.*, 1997 ; Tableau 9)

-rôle :

L'analyse de ce gène fait apparaître qu'il pourrait ne pas être essentiel à la compréhension des bases moléculaires du syndrome du hairy root, toutefois les effets de son expression font de lui un outil d'intérêt pour l'étude du développement des plantes (Tableau 10).

**Tableau 9** : Expression tissus et organes spécifiques des oncogènes et autres gènes du T-DNA des plasmides Ri (essentiellement d'après Gaudin *et al.*, 1994).

<b>Promoteur du gène</b>	<b>Spécificité</b>
<b><i>rolA</i></b>	-expression plus forte dans les tiges et plus faible dans les feuilles et les racines (Schmülling <i>et al.</i> , 1988 ; 1989 ; Carneiro et Vilaine, 1993).
<b><i>rolB</i></b>	<p>-expression faible dans les racines et les jeunes tiges (Schmülling <i>et al.</i>, 1989).</p> <p>-expression dans les cellules initiales de tous les méristèmes, dans les cellules parenchymateuses du phloème et du xylème (Schmülling <i>et al.</i>, 1989 ; Altamura <i>et al.</i>, 1991 ; Capone <i>et al.</i>, 1991 ; Nilsson <i>et al.</i>, 1997b).</p> <p>-expression des cellules du péricycle au site d'initiation des racines latérales (Nilsson <i>et al.</i>, 1997).</p> <p>-expression durant l'embryogénèse zygotique (Chichiricco <i>et al.</i>, 1992).</p> <p>-promoteur induit par l'auxine (Maurel <i>et al.</i>, 1990 ; Capone <i>et al.</i>, 1991 ; 1994).</p>
<b><i>rolC</i></b>	<p>-expression de haut niveau dans les racines et les tiges (phloème), plus faible dans les feuilles (Spena <i>et al.</i>, 1987 ; Schmülling <i>et al.</i>, 1988 ; 1989 ; Oono <i>et al.</i>, 1990).</p> <p>-variation de l'expression suivant l'organe de la plante (Leach et Aoyagi, 1991).</p> <p>-expression dans les cellules compétentes pour l'initiation des racines (Nilsson <i>et al.</i>, 1997).</p> <p>-induction faible par l'auxine dans le mésophylle de protoplastes du tabac (Maurel <i>et al.</i>, 1990).</p> <p>-promoteur fortement induit par le sucrose (Yokoyama <i>et al.</i>, 1994 ; Nilsson <i>et al.</i>, 1996).</p>
<b><i>rolD</i></b>	<p>-expression forte dans les jeunes feuilles et racines et très faible dans les organes matures (Leach et Aoyagi, 1991).</p> <p>-expression dépendant du stade de développement plutôt que de l'organe (Trovato <i>et al.</i>, 1997).</p>
<b>ORF13 (pRi8196)</b>	<p>-expression dans l'endosperme, à la jonction de l'hypocotyle-racine, au site d'émergence de la racine latérale et dans les méristèmes apicaux (Hansen <i>et al.</i>, 1997).</p> <p>-expression induite par la blessure (Hansen <i>et al.</i>, 1997).</p>

<b>ORF14</b> (pRi8196)	-expression forte dans les tissus vasculaires de l'hypocotyle et des cotylédons ; expression dans le mésophylle des cotylédons (Hansen <i>et al.</i> , 1994).
<b>ORF8</b> (pRi2659)	-mieux exprimé dans les racines que dans les feuilles quoiqu'à de très faibles niveaux (ce travail). -expression induite par l'auxine (ce travail).

#### 4.2.2.5. ORF13

Ce gène est hautement conservé parmi les différents plasmides Ri (Filetici *et al.*, 1987 ; Brevet et Tempé, 1988). Le tableau 9 montre que l'expression de ce gène est tissus, et organes spécifique (Durand-Tardif *et al.*, 1985; Taylor *et al.*, 1985 ; Hansen *et al.*,1997). Lorsque l'ORF13 est exprimé sous le contrôle du 35S dans le tabac, il conduit à l'obtention de plantes aux feuilles très gaufrées, de taille plus courte, et avec des longueurs d'internoeuds très variables, anormales. Les fleurs de ces plantes sont asymétriques, et le système racinaire reste faiblement développé (Hansen *et al.*, 1993; Lemcke et Schmülling, 1998b; Tableau 8).

D'autres altérations morphologiques telles que la formation d'éperons sur les feuilles et les pétales ont été observées. (Meyer *et al.*, 2000).

Les plantes transgéniques exprimant l'ORF13 de pRI8196 produisent un facteur diffusible qui induit le phénotype ORF13 sur des plantes normales au cours d'expérience de greffage (Hansen *et al.*, 1993). Cependant aucune transmission de phénotype n'a été observée en utilisant l'ORF13 de pRi à agropine (pHR1 ou pRiA4) (Lemcke et Schmülling, 1998b).

#### Relations avec les hormones :

Certaines des altérations phénotypiques de l'ORF13 chez les plantes transgéniques suggèrent des altérations dans l'action de la cytokinine (Hansen *et al.*, 1993 ; Lemcke et Schmülling, 1998b). Par ailleurs, des effets auxine like d'ORF13 + 14 ont également été décrits par Capone *et al.*, 1989, alors que ces gènes ne présentent aucune similitude avec les gènes de biosynthèse de l'auxine. Ces gènes seuls, ne sont cependant pas capables d'induire la formation de racines (Capone *et al.*, 1989 ; Hansen *et al.*, 1991).

Des disques de carottes inoculés avec *Agrobacterium* portant l'ORF13, surexprimé à partir du promoteur 35S du CaMV, développent des cals verts sombre (Fründt *et al.*, 1998). Quoique la nature tumorale de ces cals n'ait pas été confirmée, il faut noter qu'il s'agit là du premier rapport notifiant la prolifération de cellules, causée par les gènes du T-DNA de pRi. L'ORF13 pourrait coder une véritable oncoprotéine ; il est alors possible que les effets

« hormone like » observés soient seulement des conséquences de l'activité du produit de ce gène. En accord, les plantes ORF13 semblent être perturbées dans le processus du cycle cellulaire c'est-à-dire que le nombre de cellules qui subissent l'endoréplication est réduit dans ces plantes. (Meyer *et al.*, 2000).

**Tableau 10** : Rôles proposés pour les oncogènes et autres gènes du T-DNA des plasmides Ri.

Gène	Rôle
<b>rolA</b>	-facteur de transcription (Levesque <i>et al.</i> , 1988 ; Meyer <i>et al.</i> , 2000).
<b>rolB</b>	-initiation de la rhizogénèse à des stades précoces ; -stimule la formation de méristème (Binns et Costantino, 1998 ; Meyer <i>et al.</i> , 2000). -rôle dans le signal de transduction de l'auxine (Nilsson et Olsson, 1997).
<b>rolC</b>	-pourrait jouer un rôle dans les étapes très précoces de la rhizogénèse et un rôle lié au saccharose (Schmülling <i>et al.</i> , 1993 ; Yokoyama <i>et al.</i> , 1994 ; Nilsson et Olsson, 1997 ; Meyer <i>et al.</i> , 2000).
<b>rolD</b>	-rôle dans le développement des plantes (Binns et Costantino, 1998).
<b>ORF 13</b>	-effet régulateur sur l'endoréplication et sur la fréquence ou la vitesse du cycle cellulaire (Hansen <i>et al.</i> , 1993 ; Meyer <i>et al.</i> , 2000).
<b>ORF13a</b>	-facteur de transcription (Hansen <i>et al.</i> , 1994).
<b>ORF3</b>	-fonction de régulateur négatif (Lemcke et Schmülling, 1998b).
<b>ORF 8</b>	-activité tryptophane-2-monooxygénase (Lemcke <i>et al.</i> , 2000). -pas d'activité tryptophane-2-monooxygénase décelable (Otten et Helfer, 2001). -rôle lié à l'auxine (ce travail). -inhibition de l'exportation du saccharose (Umber <i>et al.</i> , 2002).

## 5- Les autres ORFs

Il n'existe que peu de données concernant les autres ORFs du T-DNA des plasmides Ri. Quatorze ORFs « non *rol* » du T-DNA de pRiHRI (ORF2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 13, 13a, 14, 15, 16, 17 et 18) ont été analysés, individuellement, pour leur capacité à induire la formation de racines, de pousses ou de cals sur des disques de feuilles de tabac (Lemcke et Schmülling, 1998b). Aucun de ces gènes n'a été capable d'induire une croissance organisée ou inorganisée contrairement, aux contrôles constitués par le gène *ipt* et *rolB* (ceux-ci induisent la formation de pousses et de racines respectivement ; Lemcke et Schmülling, 1998b). Seuls les ORF3 et ORF8 provoquent chez les plantes des réponses altérées aux hormones.

### 5.1. ORF3

L'ORF3 est un gène qui exprimé dans une plante, produit des altérations développementales et des réponses altérées aux hormones.

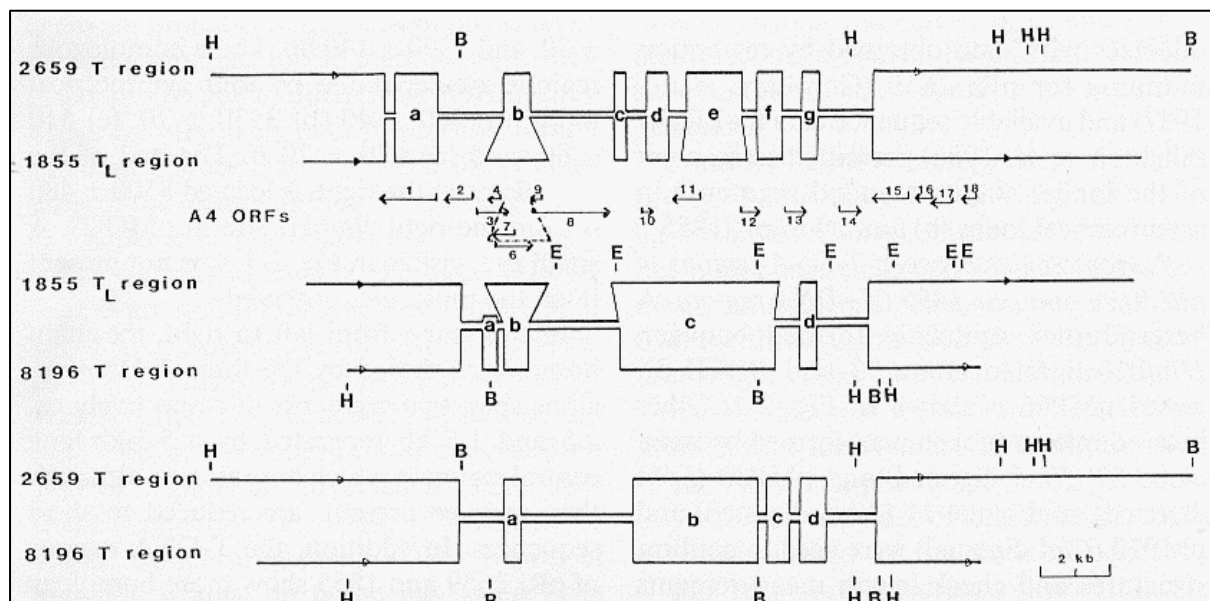
Lorsque des cals formés à partir de l'hypocotyle, de feuilles ou de racines, sont traités avec des combinaisons d'hormones, auxine/cytokinine, leur développement était significativement réduit. Cette inhibition de la dédifférenciation a conduit des auteurs (Lemcke et Schmülling, 1998) à proposer un rôle de régulateur négatif au produit du gène3, durant la pathogenèse du hairy root (Tableau 10).

Les plantes transgéniques de tabac exprimant l'ORF3 montrent une nécrose au niveau de l'extrémité des feuilles, des bractées et des sépales (Lemcke et Schmülling, 1998b ; Tableau 8). Certaines de ces altérations, comme la nécrose de l'extrémité de la feuille, constituent des phénotypes nouveaux. L'élucidation de la fonction de ce gène pourrait donc apporter de nombreuses informations sur le processus de développement du végétal et sur la pathogenèse (Meyer *et al.*, 2000).

### 5.2. ORF8

Des études d'hybridation par Southern (Spano *et al.*, 1982; Combard *et al.*, 1987; Filetici *et al.*, 1987) et de formation d'hétéroduplex au microscope électronique, ont permis de tracer des cartes d'homologies des différents T-DNAs des plasmides Ri (Costantino *et al.* ; 1981 ; Brevet et Tempé, 1988). La Figure 14 représente les homologies entre les T-DNAs des plasmides 1855 à agropine et 2659 à cucumopine, d'une part, et celles du pRi2659 avec le

pRi8196 à mannopine, d'autre part. Le TL-DNA du plasmide à agropine présente plus de séquences conservées avec le plasmide à cucumopine qu'avec le plasmide de la souche 8196 (Brevet et Tempé, 1988). De façon remarquable, parmi la région commune aux 3 types de plasmides, l'ORF8 est un des gènes les mieux conservés.



**Figure 14** : Cartes d'homologie de trois T-DNA des plasmides Ri (2659, 8196 et 1855) pris deux à deux. Les ORFs du T-DNA de pRiA4 sont représentés (Brevet et Tempé, 1988).

Les comparaisons de séquence d'acides aminés déduite de la séquence d'ADN des ORF8, révèlent une homologie faible mais significative entre la protéine ORF8 de pRiA4 et le produit du gène *tms1* (*iaaM*) d'*A. tumefaciens*, d'une part, et la protéine IaaM de *P. savastanoi*, d'autre part (Slightom *et al.*, 1986 ; Levesque *et al.*, 1988). Le degré de similitude est assez bas, mais assez fort pour indiquer une homologie dans l'évolution, suggérant une équivalence fonctionnelle. Il semblerait que les 3 séquences dérivent d'un ancêtre commun mais que la séquence ORF8 de Ri ait divergé soit rapidement, soit plus tôt que *tms1* (*iaaM*) (Levesque *et al.*, 1988). Le gène *tms1* d'*A. tumefaciens* seul, placé sous le contrôle de son propre promoteur n'a aucun effet morphologique chez le Tabac (Follin *et al.*, 1985). Sa surexpression chez le pétunia et le tabac conduit à une augmentation des niveaux d'auxine et à un phénotype anormal (Klee *et al.*, 1987).

La présence ou l'absence de l'ORF8 n'est pas associée à des changements majeurs du phénotype, même quand cet ORF est présent et transcrit (Durand-Tardif *et al.*, 1985 ; Cardarelli *et al.*, 1987).

La protéine ORF8 prédite (dite pORF8) a une structure particulière, et est probablement une protéine de fusion naturelle. Elle appartient à une famille très diverse, définie sur la base d'homologie faible et partielle des protéines entre elles. Les gènes de cette famille appelée « plast » par Levesque *et al.* (1988) ou RolB-like (Otten et Schmidt, 1998) ont en commun 180 à 260 aa.

Les pORF8 putatives, codées par les T-DNA des pRiA4 et pRi2659, ont 761 et 780 acides aminés respectivement (Tableau 11). Elles sont caractérisées par au moins 2 domaines, le domaine N-terminal (d'environ 200 aa.), et le domaine C-terminal (550 aa). Les 23 acides aminés qui constituent le site de fixation du co-enzyme FAD, déjà identifié par Levesque *et al.* (1988) comme motif caractéristique des enzymes tryptophane-2-monooxygénases, sont hautement conservés chez toutes les protéines prédites, de pORF8 aux produits des gènes *aux1* (pRiA4), de *tms1* (Ach5 ; Tm4) et de *iaaM* (*Pseudomonas savastanoi* et *Erwinia herbicola*) (Otten et Schmidt, 1998 ; Lemcke *et al.*, 2000).

**Tableau 11:** taille et produits des gènes *rol* A, B, C et des ORFs 13 et 8 des différents plasmides Ri (d'après Slightom *et al.*, 1986; Kiyokawa *et al.*, 1994; Brevet *et al.*, non publié).

	pRi2659		pRi1724		pRiA4		pRi8196	
ORF (gène)	taille pb	nombre aa	taille pb	nombre aa	taille pb	nombre aa	taille pb	nombre aa
<b>10</b> (rolA)	281	93	279	94	300	100	423	141
<b>11.</b> (rolB)	839	279	837	279	777	259	762	254
<b>12.</b> (rolC)	542	180	540	180	540	180	534	178
<b>13</b>	596	198	600	200	600	200	591	197
<b>8</b>	2342	780	nd	nd	2283	761	nd	nd

nd : non déterminé

Le domaine C-terminal de pORF8 codée par pRiA4 présente jusqu'à 38% d'homologie avec l'enzyme tryptophane-2-monooxygénase qui convertit le tryptophane en indole-3 acétamide (IAM) (Lemcke *et al.*, 2000). Il a été démontré que les plantules qui surexpriment l'ORF8 possèdent une concentration d'IAM 5 fois plus élevée que celles des plantules non transformées (Lemcke *et al.*, 2000). Les protéines extraites de plantules et d'*E. coli* surexprimant l'ORF8 autorisent un « turnover » du tryptophane en IAM plus rapide que ceux des contrôles négatifs. Ceci permet aux auteurs de déduire que le produit du gène ORF8 aurait une activité tryptophane-2-monooxygénase (Lemcke *et al.*, 2000).

Au contraire, Otten et Helfer (2001) ont montré que ni le gène entier ORF8, ni sa forme tronquée de la partie 5' n'induisent de synthèse détectable d'IAM. De plus ce gène est incapable d'induire l'apparition des racines en présence du gène *iaaH* de la souche Ach5, gène dont le produit convertit l'IAM en acide indole-3-acétique (AIA), au cours d'expériences de coinfection de tiges de Kalanchoé (Otten et Helfer, 2001).

La partie N-terminale de pORF8 montre une homologie avec la protéine RolB d'*A. rhizogenes* (33,5%) (Levesque *et al.*, 1988) et, d'une façon générale, avec les protéines appartenant à la famille RolB. Cet allongement est absent dans les protéines IaaM codées par *P. savastanoi* et *E. herbicola* (Otten et Schmidt, 1998).

Le domaine N-terminal serait responsable de la modulation de la sensibilité des cellules-hôtes à l'auxine. En effet, les plantules exprimant l'ORF8 sont capables de croître sur un milieu contenant des concentrations d'auxine qui inhibent complètement le développement post-germinal des plantules de contrôle. Contrairement à l'ORF8, les plantes transgéniques *iaaM* ne surmontent pas l'inhibition de la croissance sous l'action de l'auxine. (Lemcke et Schmülling, 1998b). Récemment, Umber *et al.* (2002) rapportent que le domaine N-terminal de l'ORF8 de pRiA4 (2x35S-A4-Norf8) augmente la sensibilité des plantules de tabac lorsqu'elles sont placées dans un milieu contenant du NAA (Umber *et al.*, 2002).

La délétion de l'extrémité 5' *rolB*-like du gène *iaaM* d'*A. tumefaciens* souche Ach5 ne conduit pas à une réduction de synthèse d'IAM chez les plantes (Otten et Helfer, 2001). De plus, ce domaine N-terminal n'affecte ni la croissance, ni la morphologie de la plante quand il est exprimé chez le tabac. Cependant, les plantes exprimant la partie *rolB*-like de l'ORF8 du pRiA4 sont de petite taille (nanisme), plus ou moins tachetées et synthétisent des quantités anormalement élevées de glucose, fructose, saccharose et amidon (Otten et Helfer, 2001).

## Chapitre II

### MATERIELS ET METHODES

#### 1- Matériels

##### 1.1. Souches bactériennes utilisées et milieux de culture

Les souches d'*Escherichia coli* ont été cultivées à 37°C en milieu LB (Sambrook *et al.*, 1989) et utilisées dans les expériences de clonage. Les souches d'*Agrobacterium* ont été cultivées à 28°C en milieu YEB (Sambrook *et al.*, 1989). La souche LBA4404 a été utilisée comme réceptrice dans les expériences d'électroporation, et comme hôte pour le vecteur binaire pBIN19 et son dérivé (pBI101) pour inoculer les disques de feuilles de tabac.

Les cultures en milieu liquide ont été réalisées sur agitateur. Les bactéries ont été entretenues par repiquage régulier sur les milieux (LB et YEB) solidifiés par addition de 15g/l de Bacto-agar (Difco).

Les bactéries hébergeant les vecteurs pK18 et pBin19 et leurs dérivés ont été sélectionnées sur milieu additionné de kanamycine à la concentration de 25µg/ml pour *E. coli* et 200µg/ml pour *Agrobacterium* (Tableau 12).

**Tableau 12** : Caractéristiques des souches.

Souches	Description	Références
<u><i>E. coli</i></u> JM83	<i>ara</i> , $\Delta(lac-pro)$ , <i>strA</i> , <i>thi</i> , Phi80, <i>lacZ</i> $\Delta$ M15	Vieira et Messing, 1982
<u><i>Agrobacterium</i></u> LBA4404	Rif, octopine, contient pAL4404, délétion du T-DNA de pTiAch5	Ooms <i>et al.</i> , 1982
A312	Km, renferme pBI121, <i>uidA</i>	Clontech Laboratories

La résistance aux antibiotiques est indiquée par une abréviation de 2 ou 3 lettres : Rif : résistance à la rifampicine ; Km : résistance à la kanamycine.

## 1.2. Plasmides utilisés

Les plasmides utilisés au cours de cette étude sont présentés dans le tableau 13.

**Tableau 13 :** Caractéristiques des plasmides.

Plasmides	Description	Références
pK18	Km, <i>lacZ</i> $\alpha$ , dérivé des pUC	Pridmore, 1987
pBIN19	Km, <i>lacZ</i> $\alpha$ +, <i>incP</i> , dérive de pRK2, possède les 2 bordures de pTi T37	Bevan, 1984 Frisch <i>et al.</i> , 1995
pBI121	Km, promoteur 35S de CaMV +gène GUS cloné dans pBIN19	Jeffersson <i>et al.</i> , 1987
pBI101-2	Km, sans promoteur + gène GUS cloné dans pBIN19	Clontech Laboratories
pMOC3	Tc, Cm, fragment <i>Bam</i> H1 de 21kb du T-DNA de pRi2659 cloné dans pBR328	Brevet et Tempé, 1988
pJBORF8	fragment <i>Sal</i> I- <i>Ssp</i> I de pMOC3 cloné dans pBIN19	ce travail
pJBPK3	fragment <i>Sph</i> I- <i>Kpn</i> I de pJBORF8 cloné dans le pK18	ce travail
pJBPK4	fragment <i>Hind</i> III- <i>Sph</i> I cloné dans pJBPK3	ce travail
pJB35S-ORF8	fragment <i>Hind</i> III- <i>Kpn</i> I de pJBPK4 cloné dans pBIN19	ce travail
pJB8-GUS	fragment <i>Sal</i> I- <i>Xho</i> II cloné dans pBI101-2	ce travail

Abréviation: résistance à la kanamycine (Km) ; à la tétracycline (Tc) ; au chloramphénicol (Cm)

Le plasmide pMOC3 (Brevet et Tempé, 1988) nous a servi de source pour le T-DNA de pRi2659. Le fragment *Sal*I-*Ssp*I de ce plasmide renferme la séquence ORF8 dans sa totalité : promoteur et partie codante. Le plasmide pJB35S-ORF8 contient la séquence codante de l'ORF8 sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV (437pb) (voir § 2.1.2). Le plasmide pJB8-GUS comprend le promoteur de l'ORF8 (fragment *Sal*I-*Xho*II) cloné en amont du gène *uidA* de pBI101-2 (Figures 15, 16, 17 et § 2.1.2).

### 1.3. Matériel végétal et conditions de culture

Les plantules de tabac (*Nicotiana tabacum* L.cv xanthi, lignée XHFD ; Tepfer, 1984) sauvages et transgéniques ont été cultivées *in vitro* sur milieu Murashige et Skoog modifié, additionné de 20g/l de saccharose (MS20) (Murashige et Skoog, 1962). Le milieu MS20 modifié (Sigma medium ; M0153) contient les macromolécules à une concentration 2 fois plus faible que le milieu MS de base. Ce milieu a été solidifié avec 8g/l de Bacto agar (Difco) supplémenté ou non par des antibiotiques.

Les cultures s'effectuent en chambre sous une photopériode de 16h à une température constante de 24°C. Les plantes de tabac sont ensuite cultivées sous serre, en jour long, sous une photopériode de 16h avec des températures diurnes et nocturnes de 24°C et 17°C, respectivement, sous une hygrométrie de 60%.

## 2- Méthodes

### 2.1. Techniques de biologie moléculaire

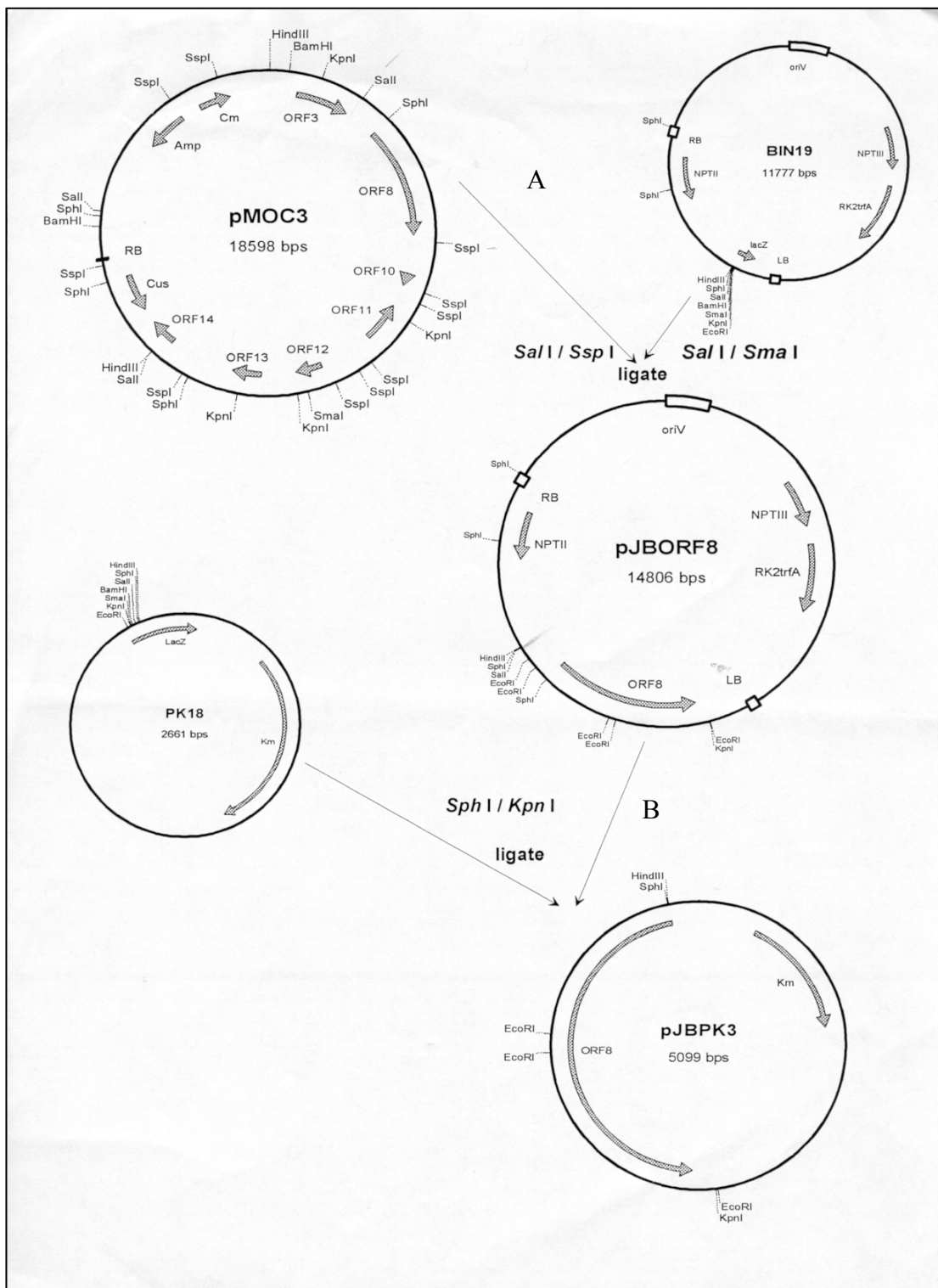
#### 2.1.1. Manipulations courantes

Les manipulations courantes de l'ADN : extractions d'ADN plasmidique, restriction, ligation, électrophorèse et électroporation ont été effectuées selon les protocoles standards, tels que décrits par Sambrook *et al.* (1989).

#### 2.1.2. Construction des plasmides

##### 2.1.2.1. Clonage de l'ORF8 sous le contrôle de son propre promoteur

Le plasmide pMOC3 a été obtenu après insertion d'un fragment *Bam*HI de 21kb comprenant le T-DNA du pRi2659 à cucumopine, inséré dans pBR328 (Brevet et Tempé, 1988 ; Figure 15). Ce plasmide nous a servi de source pour le gène ORF8, utilisé dans ce travail. Le fragment *Sal*I / *Ssp*I du plasmide pMOC3 contient la totalité de l'ORF8, partie codante et région régulatrice. Ce fragment *Sal*I / *Ssp*I de 3048pb a été cloné aux sites *Sal*I et *Sma*I du plasmide vecteur pBIN19 ; le plasmide résultant a été appelé pJBORF8 (Figure 15A).



**Figure 15 :** Construction des plasmides pJBORF8 et pJBPK3. **A-** le fragment *SalI / SspI* de 3048pb de pMOC3 est introduit dans les sites *SalI* et *SmaI* du vecteur pBIN19 (pour détails voir texte § 2.1.2) **B-** le fragment *SphI / KpnI* de 2470pb (partie codante de l'ORF8) est inséré aux mêmes sites de restriction du vecteur pK18.

### 2.1.2.2. Clonage de l'ORF8 sous le contrôle du promoteur 35S CaMV

La réalisation de cette construction a nécessité plusieurs étapes successives de clonage.

#### -amplification d'un promoteur minimal du 35S CaMV

La source du promoteur 35S vient du plasmide pBI121 de Jefferson (Jefferson *et al.*, 1987) fourni par Clontech Laboratories. La disposition des sites de restriction de ce plasmide ne permettait pas de cloner l'ORF8 dans une orientation correcte par rapport à celle du promoteur. Ceci nous a amené à synthétiser une copie du promoteur 35S par la technique PCR, en plaçant de part et d'autre du fragment amplifié les sites de restriction *Hind*III et *Sph*I. Le produit PCR obtenu de 437pb appelé « promoteur minimal 35S » a été séquencé selon la méthode de Sanger (Kit Pharmacia) afin de vérifier la conformité de la copie avec la séquence d'origine. Son activité GUS a été comparée à celle du promoteur 35S de référence (Jefferson *et al.*, 1987) de pBI121 de la souche A312. L'activité GUS du promoteur minimal ne présentait pas de différence significative avec celle du promoteur 35S CaMV de référence comme il a déjà été mentionné par Odell *et al.* (1985).

#### -obtention de pJB35S-ORF8 :

##### -1<sup>ère</sup> étape :

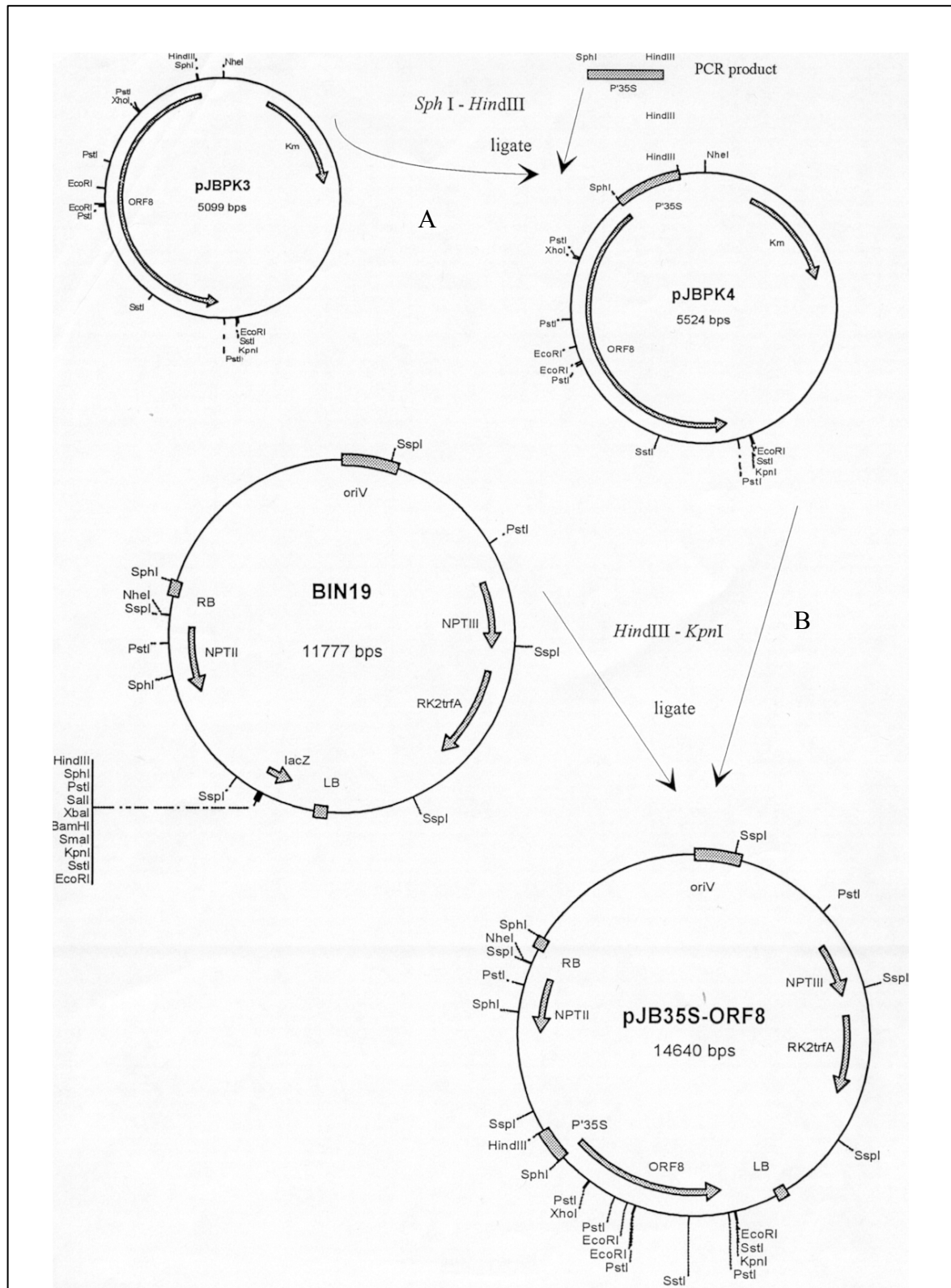
Le fragment *Sph*I / *Kpn*I, comprenant la partie codante de l'ORF8 soit 2470pb, obtenue à partir du plasmide pJBORF8, a été cloné dans le vecteur pK18 aux mêmes sites, donnant lieu au plasmide recombinant pJBPK3 (Figure 15B).

##### -2<sup>ème</sup> étape :

Le fragment *Hind*III / *Sph*I amplifié correspondant au promoteur minimal 35S a été inséré aux sites *Sph*I et *Kpn*I de pJBPK3, en amont de la partie codante de l'ORF8. Le plasmide recombinant résultant constitue le pJBPK4 (Figure 16A).

##### -3<sup>ème</sup> étape :

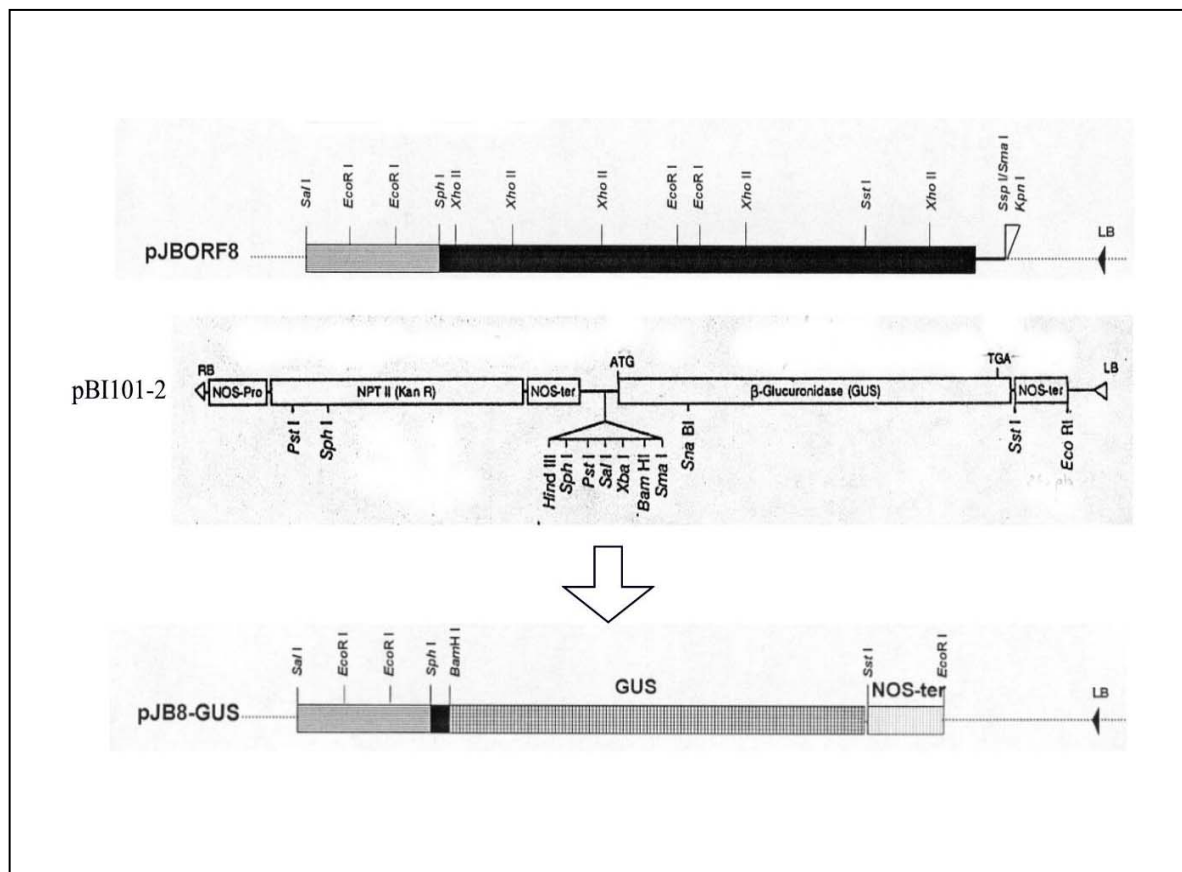
Le fragment *Hind*III / *Kpn*I comprenant l'ORF8 sous le contrôle du promoteur 35S a été inséré aux mêmes sites du vecteur navette pBIN19. Le plasmide obtenu a été appelé pJB35S-ORF8 (Figure 16B).



**Figure 16 :** Différentes étapes de clonage de pJB35S-ORF8. **A-** le promoteur minimal 35S, produit amplifié de 437pb est cloné aux sites *Sph*I et *Hind*III de pJBPK3. **B-** le fragment *Hind*III / *Kpn*I de 2907pb est introduit aux mêmes sites du vecteur navette pBIN19 (pour détails voir texte § 2.1.2).

### 2.1.2.3. Clonage du promoteur ORF8 en amont de gène rapporteur uidA

Le fragment *Sal*I / *Xho*II de 640pb du plasmide JBORF8 correspondant à la région régulatrice de l'ORF8 (soit 580pb en amont de l'ATG de l'ORF8 et 60pb de sa partie codante) a été fusionné avec le gène *uidA*, responsable de la glucuronidase (GUS) d'*E.coli*, aux sites *Sal*I-*Bam*HI du pBI101-2 en phase avec l'ATG, donnant pJB8-GUS (Figure 17). Cette construction a été vérifiée par séquençage selon la méthode de Sanger (Kit Pharmacia).



**Figure17** : Construction du plasmide pJB8-GUS. Le fragment *Sal*I / *Xho*II de 640pb représentant la région promotrice de l'ORF8 provenant de pJBORF8 est introduit aux sites *Sal*I et *Bam*HI du vecteur pBI101-2 (voir texte § 2.1.2).

### 2.1.3. Amplification par PCR

Le principe de l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) repose sur la répétition de 3 processus : la dénaturation des 2 brins d'ADN à température élevée, l'hybridation des amorces et l'élongation à partir de ces amorces.

### 2.1.3.1. Amplification du promoteur minimal 35S CaMV

Les amorces d'amplification du promoteur minimal 35S (427pb) ont été définies à partir des séquences publiées du promoteur 35S CaMV du pBI121 de Jefferson (Jefferson *et al.*, 1987) entre un site *HincII* (souligné) et la fin du promoteur. Pour faciliter le clonage, ces amorces ont été allongées en 5' l'une du site restriction *HindIII* et l'autre du site de restriction *SphI* (en gras, ci-dessous) :

5'**AAGCTT**CGTCAACATGGTGGAGC3' et

5'**GCATGCTGGTCCTCTCCAAATGAA**3'

La préparation de l'ADN plasmidique a été réalisée selon une technique de minipréparation d'après Sambrook *et al.* (1989). Le protocole de la réaction de PCR a été celui préconisé par Saïki (1990) en utilisant les conditions standards.

Le mélange réactionnel de 100µl comprend 50pMol de chacune des amorces, 20µM de chaque dNTP (Pharmacia), 1,25pg d'ADN et 1unité de polymérase Taq (Appligène) dans 10µl de tampon(x10) Taq (Appligène contenant du MgCl<sub>2</sub>). Les milieux réactionnels étaient recouverts par 70µl d'huile minérale.

Le programme d'amplification (appareil Crocodile II Appligène) est le suivant :

- 1<sup>ère</sup> étape :                    5min à 94°C                    (dénaturation)
- 2<sup>ème</sup> étape :                    1min à 94°C                    (dénaturation)  
    1min à 55°C                    (hybridation des amorces)  
    2min à 72°C                    (élongation),

Cette 2<sup>ème</sup> étape est répétée 30 fois

- 3<sup>ème</sup> étape :                    5min à 72°C                    (fin d'élongation)

L'ADN obtenu après amplification est extrait par un mélange phénol/chloroforme (v/v), précipité et analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% en présence de Bet (Bromure d'éthidium).

### 2.1.3.2. Analyse par PCR et RT-PCR

L'incorporation dans le génome des cellules de tabac des gènes ORF8 et 35S-ORF8 et leur expression ont été confirmées par PCR et reverse transcriptase PCR (RT-PCR) comme décrit par Saïki (1990) et Kawasaki (1990), respectivement.

Pour l'analyse par PCR, un fragment de 649pb de l'ORF8 compris entre les coordonnées 5772 et 6421 de la séquence du pRi2659 (données du laboratoire : GenBank, accession AJ271050) a été amplifié en utilisant les amorces suivantes :

5'ATGGCAAACAACACTGATTTTGC

5'CAATTCAGGAAAGACAGCAGC

Un fragment de 501pb du gène nitrate réductase (*nia-2*) du tabac (Vaucheret *et al.*, 1989) compris entre les coordonnées 997 et 1497 de la séquence X14058, servant de signal interne, a été amplifié en utilisant les oligonucléotides amorces suivants :

5'AGAAGCCGGTTTATCCCG

5'GTAACGGGCAATTCTCTGGA

L'extraction des ARNs totaux a été menée sur 100mg de feuilles de tabac cultivé *in vitro*, en suivant le protocole de RNeasy Plant RNA (Kit Quiagen). Les ARNs totaux obtenus sont ensuite soumis à l'action de la DNase (Promega) pour éliminer toute trace d'ADN de la préparation des ARNs totaux. Ces ARNs ainsi traités vont servir à la synthèse de l'ADNc suivant le protocole « 1st Strand cDNA Synthesis » réalisé avec le kit Boehringer Mannheim. Dans cette réaction 0,5µg d'ARN totaux sont utilisés comme substrat, par 20U d'enzyme « AMV transcriptase reverse » et 1,6µg d'amorces oligodT.

La réaction est incubée comme suit : 10min à 25°C (hybridation amorce/ARN) ; 60min à 42°C (synthèse du l'ADNc par la transcriptase reverse) ; 5min à 99°C puis 5min à 5°C (dénaturation de l'enzyme).

L'ADNc synthétisé est amplifié par PCR en utilisant les amorces spécifiques de l'ORF8 et les amorces du gène de la nitrate réductase de tabac, en tant que signal interne, soit 12,5pM de chacune des amorces.

Le programme d'amplification (Crocodile III Appligène) suivi est : 5min à 94°C pour le 1<sup>er</sup> cycle suivi de 35 cycles de 5min à 94°C, 1min à 56°C, 1,30 min à 72°C et le dernier cycle de 5min à 72°C.

#### **2.1.4. Extraction d'ADN génomique de plantes de tabac**

La minipréparation d'ADN génomique a été réalisée sur des disques de feuilles de plantes de tabac cultivées *in vitro* selon la méthode Edwards (Edwards *et al.*, 1991). Un disque de feuilles de tabac (1cm) est broyé dans un tube Eppendorf (1,5ml) pendant 15secondes, après immersion dans de l'azote liquide, en présence de 400µl de tampon d'extraction (Tris-Hcl, 200mM, pH = 7,5 ; NaCl, 250mM ; EDTA, 25mM ; SDS, 0,5%). Après centrifugation de 1min à 13000rpm, l'extrait contenu dans le surnageant est précipité avec de l'isopropanol (v/v) et centrifugé 5min à 13000rpm. Le culot d'ADN obtenu est séché sous vide, puis repris dans 100µl de tampon TE X10 (Tris-HCl, 50mM, pH = 8 ; EDTA, 10mM) en présence de RNase (Boehringer, Mannheim) à 20µg/ml. Un contrôle de concentration de l'ADN est fait sur un gel

d'agarose à 0,6%. 1µl d'ADN est utilisé pour une réaction de PCR. Le reste de l'ADN est gardé à -20°C.

### 2.1.5. Séquençage de l'ADN

La détermination de séquences nucléotidiques a été réalisée pour vérifier les constructions des plasmides : dans le 1<sup>er</sup> cas, nous avons vérifié l'amplification des 437pb du promoteur minimal 35S et comparé cette séquence à la séquence de référence initiale (Jefferson *et al.*, 1987). Dans le 2<sup>ème</sup> cas, nous avons séquencé la fusion du promoteur ORF8 avec le gène *uidA* et vérifié s'il était en phase avec ce gène. Dans les 2 cas, la technique utilisée est celle dite des 'didéoxy', qui est basée sur la terminaison base-spécifique de l'extension enzymatique d'une amorce (Sanger *et al.*, 1977). Les réactions ont été effectuées comme préconisé dans le Kit de séquençage T7 (Pharmacia).

## 2.2. Techniques de biologie végétale

### 2.2.1. Obtention de plantes transgéniques

Les plantes de tabac *Nicotiana tabacum* L.cv. xanthi (lignée XHFD) sauvages ont été obtenues à partir de graines cultivées en serre.

Les plantes transformées génétiquement ont été obtenues en inoculant des disques foliaires par des suspensions bactériennes d'*Agrobacterium*, selon la méthode décrite par Horsch *et al.*, (1985). La suspension bactérienne est constituée de la souche LBA4404 hébergeant les construits plasmidiques pJBORF8 ou pJB35S-ORF8 ou pJB8-GUS (§ 2.1.2) portant le gène *nptII* qui code pour la résistance à la kanamycine, et sert de marqueur sélectif.

#### -transformation de disques foliaires :

A partir de jeunes plantes de tabac (20 à 30cm), les 3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> feuilles sont prélevées, rincées à l'éthanol (70%) puis à l'eau distillée et immergées dans une solution d'hypochlorite de calcium (90g/litre) pendant 10min. Elles sont ensuite rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile. Les disques foliaires sont découpés à l'emporte-pièce de 1cm de diamètre. Les disques foliaires découpés sont immergés dans la solution bactérienne (culture d'une nuit), centrifugée et reprise dans 100µl d'eau distillée stérile, face inférieure en contact avec les bactéries, pendant 1 à 5min. Les disques foliaires égouttés sur papier filtre stérile sont ensuite disposés dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée.

-sélection et régénération :

Après 48h à 25°C, ces disques débarrassés de l'excès de bactéries sont transférés sur le milieu MS20 additionné de kanamycine (100mg/l) marqueur de la construction à étudier, de céfotaxime (200mg/l) pour éliminer la contamination bactérienne, et d'hormones : NAA ( $\alpha$  naphthalenacetic acid) à 0,1mg/l et 6-BAP (6-benzylamino purine) à 1mg/l pour la régénération de plantules. Après 2 semaines d'incubation en chambre de culture, ces disques sont transférés sur le même milieu de régénération frais. Les pousses apparaissent sur les disques foliaires 3-4 semaines après inoculation. Ces pousses sont excisées et transférées sur un milieu MS20 additionné de céfotaxime et de kanamycine mais dépourvu d'hormones favorisant ainsi l'induction de racines. Les plantules formées sont transférées dans des pots Magenta sur milieu MS20 additionné de kanamycine et régulièrement bouturées donnant des plantes *in vitro*. Après 3-4 semaines ces plantules sont mises en terreau sous serre et développées jusqu'à autofécondation. Les plantes issues de cette autofécondation sont cultivées sur milieu MS20 en présence de kanamycine (100mg/l) et de céfotaxime (200mg/l).

Les plantes de *Nicotiana tabacum* L.cv. xanthi transformées par le plasmide pJBORF8 ou pJB35S-ORF8 ont été appelées plantes pro8-ORF8 et plantes 35S-ORF8, respectivement. Les plantes dénommées pro8-GUS sont celles qui ont été transformées par le plasmide pJB8-GUS.

### **2.2.2. Germination des graines**

Les graines issues des plantes transgéniques pro8-ORF8, 35S-ORF8 et des plantes de tabac sauvages sont stérilisées avec de l'alcool à 95°C pendant 30 secondes, rincées 3 fois à l'eau distillée stérile et séchées sur papier filtre stérile. Ces graines sont ensuite, mises à germer sur un milieu MS20 additionné ou non de différentes concentrations d'hormones. Les concentrations de NAA déterminées après plusieurs essais, varient de 5 $\mu$ M à 25 $\mu$ M. Pour chaque expérience, répétée au moins 3 fois, quatre boîtes de Pétri contenant 25graines/boîte ont été utilisées et mises en chambre de culture (éclairage 20%). L'examen de ces boîtes a été fait chaque semaine pendant plus d'un mois.

Les mesures de la longueur et de la largeur des cotylédons des différentes plantules transgéniques et sauvages, qui ont poussé sur milieu MS sans hormone ainsi que le dénombrement des plantules ayant poussé sur milieu additionné d'hormone ont été effectuées chaque semaine.

### 2.2.3. Induction racinaire sur disques foliaires

Des disques foliaires issus de plantes transgéniques cultivées *in vitro* et de plantes non transformées de 1cm de diamètre, préparés comme décrit précédemment (§ 2.2.1) puis déposés sur milieu MS contenant du NAA à différentes concentrations. Cinq boîtes renfermant 6 disques chacune sont mises en chambre de culture. Le dénombrement de racines visibles par disque et par boîte a été réalisé à la 1<sup>ère</sup> et 3<sup>ème</sup> semaine. L'expérience a été répétée au moins 3 fois.

### 2.2.4. Métabolisme du NAA chez les plantules transgéniques

Les graines 35S-ORF8 et les graines de *N. tabacum* sauvage sont mises à germer sur milieu MS20 en chambre de culture (éclairage 20%). Après 12 jours, les plantules sont incubées dans 2ml de milieu MS20 liquide pour 100mg de plantule, pendant toute une nuit. Cent µl de NAA-H<sup>3</sup> ( $2 \times 10^{-6}$ M) sont ajoutés, dans chaque boîte et laissés sous agitation pendant 1 heure ou une nuit à l'obscurité.

#### 2.2.4.1. Mesure de l'incorporation de l'auxine (NAA)

Les plantules (100mg) sont rincées 2 fois à l'eau distillée stérile glacée et mises dans 500µl d'éthanol. Quatre ml de liquide de scintillation sont ajoutés à chaque échantillon. Le comptage de la radioactivité des plantules et du milieu d'incubation a été fait en prenant des témoins contenant uniquement du NAA radioactif et du milieu de culture seul.

#### 2.2.4.2. Analyse des dérivés métaboliques

Pour l'analyse du métabolisme, après rinçage à l'eau glacée, les plantules (100mg) sont congelées à l'azote liquide et laissées toute une nuit à -20°C dans 500µl de méthanol par échantillon. Le lendemain, les plantules sont écrasées avec un piston conique et le broyat centrifugé. Le surnageant est déposé sur une plaque de silice pour chromatographie en couche mince, développé dans un système de solvants chloroforme/méthanol/acide acétique (75/20/5 - v/v). La présence de composés tritiés a été quantifiée au moyen d'un analyseur linéaire (Trace Master Berthold LB 284).

### 2.2.5. Mesure de l'activité GUS

L'activité GUS a été recherchée sur les différents organes (les racines, feuilles et fleurs) des plantes de tabac transformées par le plasmide pJB8-GUS et des plantes de tabac sauvage.

De plus, des disques foliaires et des racines issus de plantes transgéniques ont été incubés en présence de NAA à différentes concentrations (de  $10^{-8}$  à  $10^{-2}$  M) et leur activité GUS mesurée, après 24 heures. D'autre part, l'incubation à  $10\mu\text{M}$  de NAA de disques foliaires de plantes pro8-GUS a été mesurée à différents temps (de 2 à 24heures).

Le dosage de l'activité GUS a été réalisé comme suit : les racines et feuilles de la plante sont coupées en fragments (fragment de racine de 2cm ; disque foliaire de 1cm de diamètre) et incubées dans  $250\mu\text{l}$  de tampon d'extraction (Jefferson *et al.*, 1987) puis broyées à l'aide de pistons coniques. Après 15min de centrifugation,  $100\mu\text{l}$  de surnageant sont prélevés et ajoutés à  $250\mu\text{l}$  de milieu d'incubation contenant 1mM de 4-méthyl umbelliferyl glucuronide (MUG) (Sigma) en solution dans du tampon d'extraction. Les échantillons sont incubés à  $37^{\circ}\text{C}$ . Cent  $\mu\text{l}$  du mélange réactionnel sont prélevés après 60, 120, 180 minutes et à d'autres temps, et ensuite ajoutés à 2ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,2M) pour stopper la réaction enzymatique.

Composition du tampon d'extraction :

Tampon phosphate de sodium pH = 7	50mM
$\beta$ -mercaptoéthanol	10mM
EDTA	10mM
Sodium lauryl sarcosine	0,1% (p/v)
Triton X-100	0,1% (v/v)

La fluorescence de la 4-méthyl umbelliférone (MU), molécule résultant de l'hydrolyse du substrat MUG par l'activité GUS, est lue sur un fluorimètre (Kontron SFM25) après excitation à 365nm et émission à 455nm. La calibration, lors de chaque utilisation du fluorimètre, s'effectue avec une solution standard de MU à 100nM fraîchement préparée. La pente de la droite de régression établie à partir des mesures effectuées aux différents temps constitue la base de mesure de l'activité glucuronidase. Le contenu protéique de chaque extrait est déterminé par la réaction de Bradford (Bradford, 1976 ; Kit laboratoires Biorad). L'activité GUS est alors exprimée en pMol. de MU apparue, par mg de protéine, par minute.

### **2.2.6. Ultrastructure cellulaire des cotylédons**

Des échantillons de cotylédons et de jeunes feuilles de *N. tabacum* L.cv xanthi sauvage et transgéniques (35S-ORF8) sont fixés dans une solution de tampon à 0,1M de cacodylate acétate (pH = 7,2) contenant 4% de glutaraldhyde pendant 3 heures à température ambiante. Après 10min de rinçage avec la solution tampon, les échantillons ont été fixés dans la même solution tampon renfermant 2% de tétraxide d'osmium durant 1 heure et rincés 3 fois à l'eau distillée. La déshydratation a été faite par passage dans une série de bains d'acétone. Les échantillons déshydratés sont ensuite imprégnés et enrobés dans une résine époxy fraîchement

préparée et polymérisée à 70°C pendant 8 heures (Spurr, 1969). Des coupes de 20 à 40nm ont été réalisées avec un ultramicrotome (Reichert Ultracut, Wien, Austria) et fixées avec de l'acétate d'uranyle à 2% pendant 1 heure, recouvertes de citrate durant 5min puis observées au microscope électronique (Philips E.M-200, Einhoven, The Netherlands).

### **2.3. Recherche des homologies de séquences**

L'alignement des séquences a été réalisé selon le programme DOTPLOT (Maizel et Lenk, 1981) et la recherche de motifs a été faite suivant le programme DBGET (prosite (doc) et tformatix), site (<http://www.motif.genome.ad.jp>).

## Chapitre III

# RESULTATS

## 1- Morphogénèse des plantes de tabac transgéniques

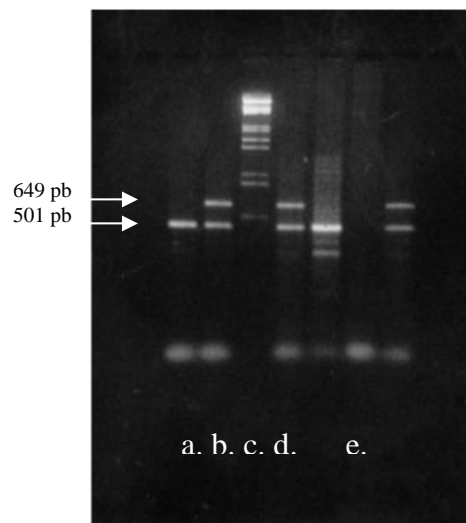
### 1.1. Caractérisation des plantes de tabac transgéniques

#### 1.1.1. Résistance à la kanamycine

Parmi les plantules de *N. tabacum* L. cv xanthi obtenues après transformation des disques foliaires (Chapitre II, § 2.2.1), seules celles qui présentent une résistance à la kanamycine (100µg/ml) ont été retenues. Ces plantules sont alors transférées sous serre et laissées jusqu'à autofécondation. La lignée issue de cette autofécondation (T1) est également sélectionnée sur milieu MS additionné de kanamycine (100µg/ml) et de céfotaxime (200µg/ml). La ségrégation pour le caractère de résistance à la kanamycine est du type 3:1, suggérant qu'il y a seulement une insertion du T-DNA chez cette lignée transgénique (T1). Toutes les plantes transgéniques ayant poussé sur milieu MS supplémenté de kanamycine et de céfotaxime forment des racines et se développent normalement, contrairement aux plantes de tabac sauvages.

#### 1.1.2. Intégration de l'ORF8 dans le génome de plantes de tabac

La présence du gène ORF8 ou 35S-ORF8 a été recherchée par PCR. Le choix de cette technique se fonde sur sa sensibilité et de la disponibilité de faible quantité de matériel végétal. Le résultat obtenu, pour deux plantes transgéniques pro8-ORF8 et 35S-ORF8, est représenté Figure 18. La bande de 649pb correspond au fragment amplifié de l'ORF8 et la bande inférieure représente le fragment amplifié de 501pb du gène de la nitrate réductase du tabac utilisé comme signal interne.



**Figure 18** : Analyse des produits de PCR obtenus après amplification de l'ORF8 chez les plantes transgéniques de *Nicotiana tabacum* L.cv xanthi :

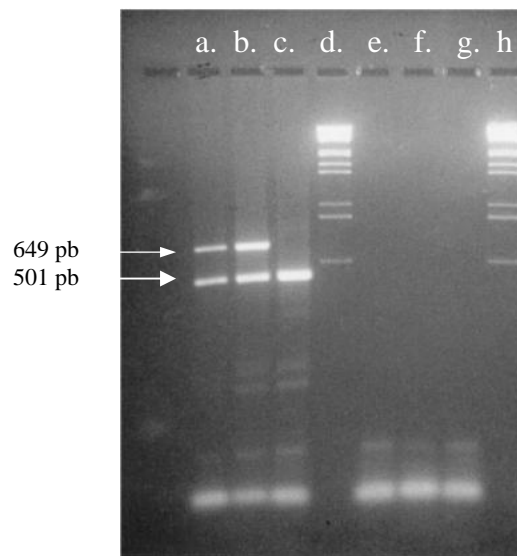
- a- contrôle interne : gène de la nitrate réductase de plante de tabac sauvage.
- b- produits de PCR des plantes de tabac transformées avec le gène ORF8.
- c- ADN marqueur : ADN de lamda digéré par *HindIII* et *EcoRI*.
- d- produits de PCR de plantes de tabac transformées avec le gène 35S-ORF8.
- e- contrôle négatif : pas d'échantillon d'ADN.

Les flèches indiquent les produits de PCR obtenus : le fragment de 649pb correspond au gène de l'ORF8 et celui de 501pb au gène de la nitrate réductase.

### 1.1.3. Recherche des transcrits

Les ARNs messagers matures des plantes ORF8 et 35S-ORF8 ont été détectés par la reverse transcriptase PCR (RT-PCR), plus sensible que l'hybridation type Northern, mais essentiellement qualitative. Les produits de l'amplification analysés par électrophorèse sur gel d'agarose horizontal à 1,5% sont présentés dans la Figure 19.

Parmi les plantes transgéniques pro8-ORF8 et 35S-ORF8 résistantes à la kanamycine et ayant intégré dans leur génome l'ORF8 et le 35S-ORF8, respectivement, et transcriptionnellement actives, deux lignées transgéniques (T1), l'une exprimant l'ORF8 sous le contrôle de son propre promoteur (pro8-ORF8-6) et l'autre exprimant l'ORF8 sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV (35S-ORF8-11), ont été retenues pour la suite des expériences



**Figure 19 :** Analyse des transcrits par la réverse transcriptase PCR (RT- PCR) des plantes transgéniques de *N. tabacum* L.cv xanthi :

- a- produits de RT-PCR des plantes de tabac transformées avec le gène ORF8.
- b- produits de RT-PCR des plantes transgéniques 35S-ORF8.
- c- Produit de RT-PCR de la nitrate réductase de plantes de tabac sauvages.
- d, h : ADN marqueur : ADN de lamda digéré par *HindIII* et *EcoR1*
- e, f, g : contrôles ARN : échantillons avec de l'ARN des plantes de tabac transformées et sauvages, respectivement.

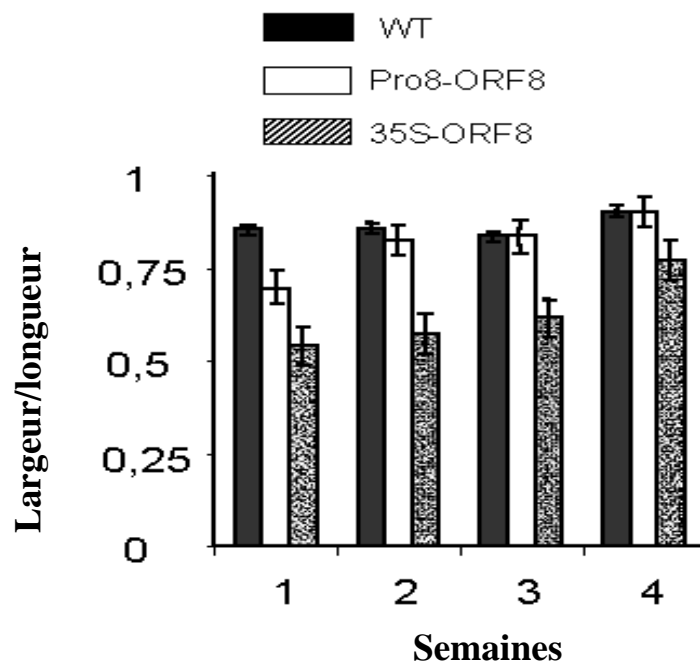
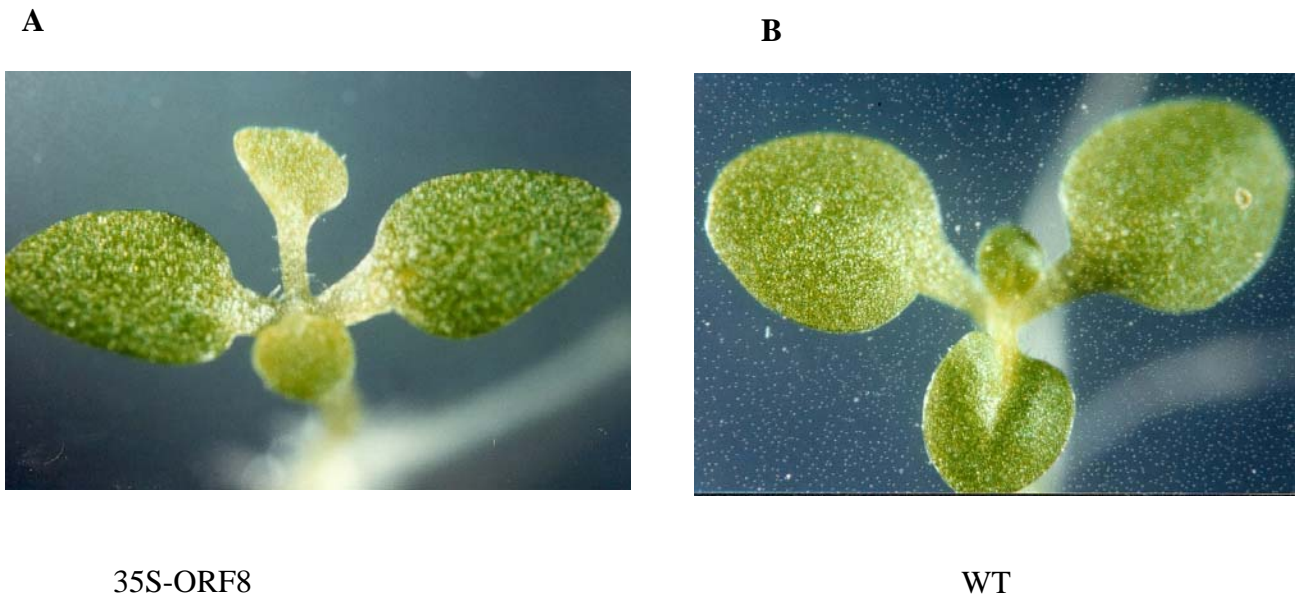
La bande de 649pb correspond au fragment de l'ADNc amplifié du gène ORF8 et la bande de 501pb représente le fragment de l'ADNc amplifié du gène de la nitrate réductase.

## 1.2. Phénotype des plantes de tabac transgéniques

La germination et le développement *in vitro* des plantules transgéniques T1, aussi bien que les générations suivantes présente un temps de développement normal. Cependant, dans les 1ères semaines, les plantules 35S-ORF8-11 ont montré des cotylédons ayant une forme plus étroite et pointue que les cotylédons des plantules sauvages (Figure 20A et B). Cette forme pointue des cotylédons apparaît comme une propriété commune à la population de plantes transgéniques. Les mesures de ces cotylédons prises chaque semaine, ont révélé que la valeur du rapport des dimensions de la largeur sur la longueur des cotylédons était plus faible, comparée à celle du contrôle (Tableau 14 ; Figure 20 en bas). Par contre, les plantules pro8-ORF8-6 ont montré un phénotype intermédiaire durant les deux premières semaines (Figure 20 en bas).

**Tableau 14** : Valeurs des longueurs (L) et largeurs (l) des cotylédons de plantes sauvages (WT) et transgéniques (pro8-ORF8 et 35S-ORF8). Les mesures ont été faites sur 25 échantillons  $\pm$  l'écart-type.

Semaines		WT	Pro8-ORF8	35S-ORF8
1	L	$2.34 \pm 0.2843$	$2.56 \pm 0.3062$	$2.07 \pm 0.1534$
	l	$1.98 \pm 0.2185$	$1.79 \pm 0.2466$	$1.12 \pm 0.1633$
2	L	$3.23 \pm 0.3221$	$3.01 \pm 0.3102$	$3.22 \pm 0.3172$
	l	$2.77 \pm 0.2492$	$2.48 \pm 0.2693$	$1.84 \pm 0.3136$
3	L	$3.58 \pm 0.3440$	$3.21 \pm 0.3042$	$4.05 \pm 0.2443$
	l	$2.99 \pm 0.3571$	$2.68 \pm 0.2505$	$2.60 \pm 0.3378$
4	L	$4.21 \pm 0.6021$	$4.03 \pm 0.2906$	$4.26 \pm 0.5025$
	l	$3.80 \pm 0.7947$	$3.63 \pm 0.2322$	$3.28 \pm 0.3958$



**Figure 20** : Phénotype des cotylédons de tabac transgénique et sauvage.

**En haut**, forme des cotylédons des plantes de tabac transformées avec le gène 35S-ORF8 (**A**) et de tabac sauvage (WT ; **B**). Les cotylédons des plantes transgéniques ont une forme lancéolée et plus pointue par rapport aux cotylédons de *N. tabacum* L.cv xanthi sauvage.

**En bas**, valeurs du rapport largeur/longueur des cotylédons des plantes transgéniques et sauvages durant les 4 premières semaines de développement. Cette valeur est plus faible pour les cotylédons 35S-ORF8 reflétant bien la forme pointue, alors que les cotylédons pro8-ORF8 présentent une valeur intermédiaire par rapport aux sauvages (WT). Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  l'écart-type (n =25).

Les cotylédons des plantules transgéniques 35S-ORF8-11 retrouvent une forme et un développement normal après la 4<sup>ème</sup> semaine. Cette caractéristique, c'est à dire le retour à la « forme sauvage », a également été observée chez les autres lignées transgéniques. Par la suite, lorsque les plantules sont transférées sous serre, leur croissance et leur fertilité étaient tout à fait normales et aucune altération phénotypique n'a été observée.

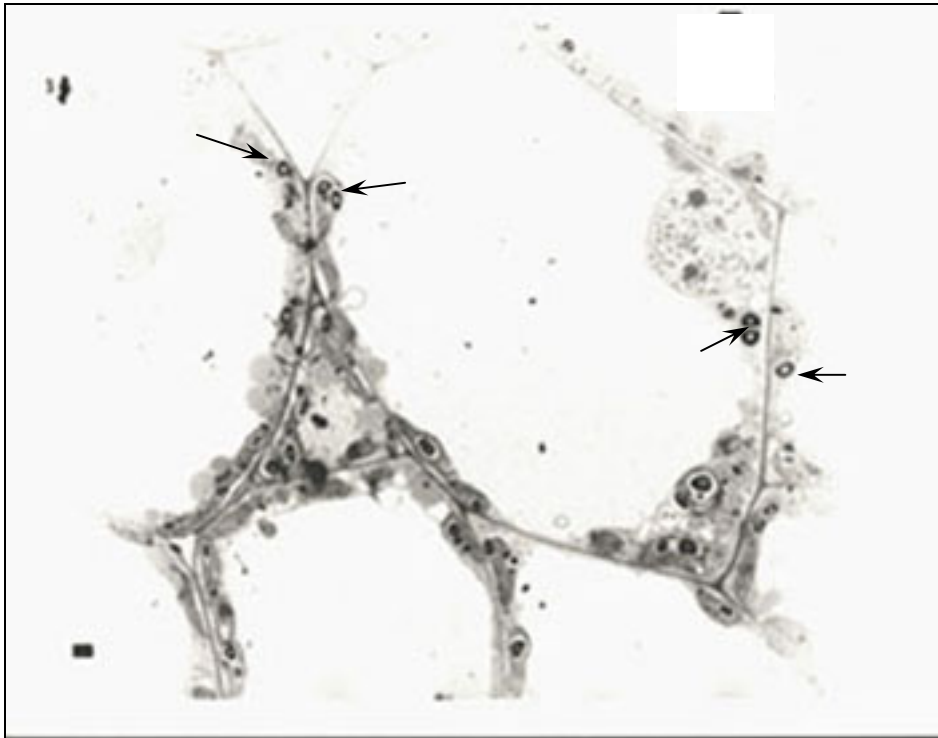
### 1. 3. Structure et ultrastructure cellulaire des cotylédons

L'expansion et la division cellulaires figurent parmi les multiples aspects de l'effet de l'auxine sur le développement et la croissance des plantes. La forme lancéolée des cotylédons transgéniques pouvait être due à la taille ou au nombre de cellules dans les tissus de ces derniers (Hemerly *et al.*, 1995).

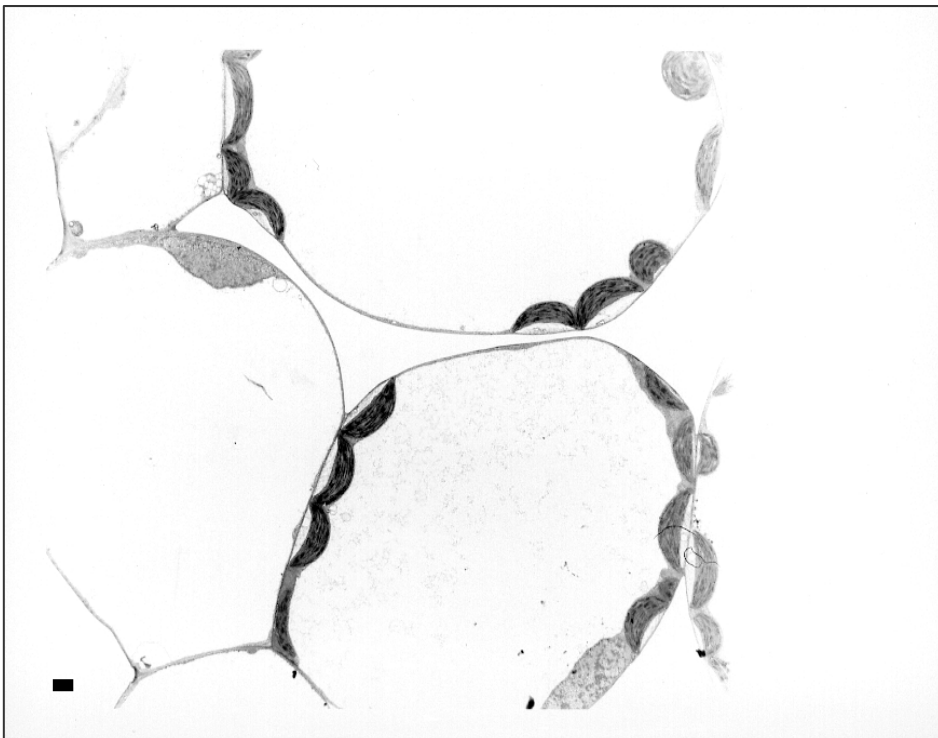
Des coupes au niveau des cotylédons ont donc été réalisées et observées au microscope photonique. Aucune différence significative n'a été constatée entre les coupes des plantules transgéniques et celles du contrôle, ni au regard de la taille des cellules, ni au regard du nombre de cellules dans les tissus (résultats non présentés). Hemerly *et al.* (1995) ont étudié la relation entre la morphogenèse et la division cellulaire chez *Arabidopsis* ainsi que chez des plantes de tabac et ont montré que, chez les plantes, le contrôle du développement relatif à la forme peut agir indépendamment de la quantité de division cellulaire.

Par contre, l'observation et la comparaison de l'ultrastructure cellulaire des cotylédons et des feuilles issus de plantes 35S-ORF8 avec celle de ces organes chez le tabac sauvage a révélé une abondance des grains d'amidon chez les transgéniques par rapport au tabac sauvage. La Figure 21 montre des cellules de cotylédons (A) de *N. tabacum* L. cv xanthi 35S-ORF8 de pRi2659 observées au microscope électronique présentant des granules d'amidon par rapport aux cellules de tabac non transformé (B).

**A**



**B**



**Figure 21** : Ultrastructure des cellules de cotylédons de tabac transgéniques 35S-ORF8 et de tabac sauvages. Les cellules des cotylédons transgéniques (**A**) renferment de nombreux grains d'amidon (flèches) comparées aux cellules du tabac sauvages (**B**). La barre = 1 $\mu$ m

## 2. Réponses des tissus transgéniques à l'auxine exogène

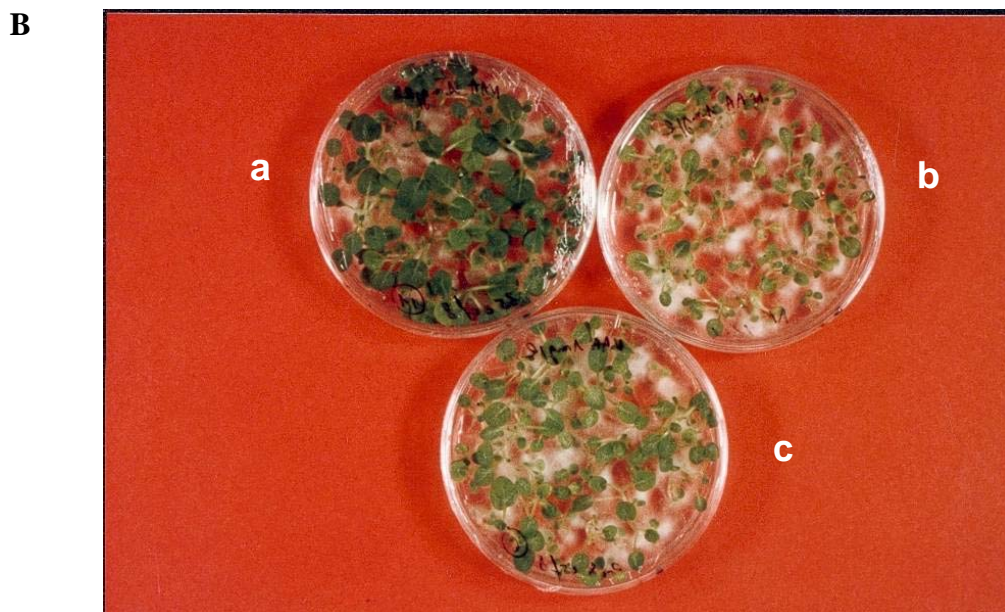
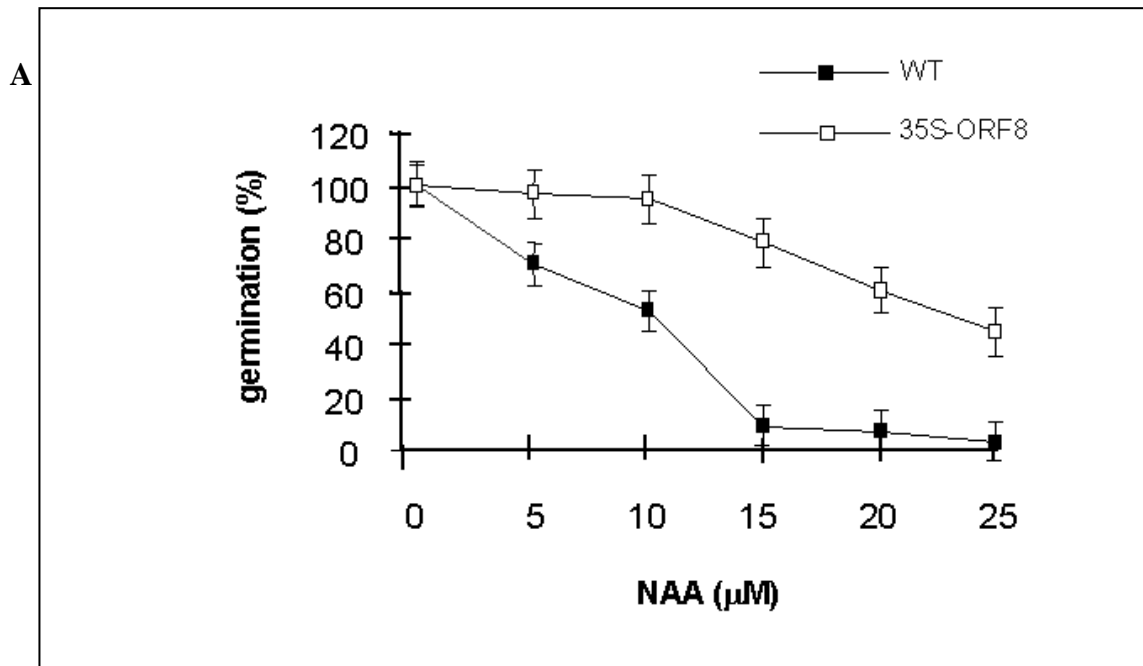
### 2.1. Résistance à l'auxine

#### 2.1.1. Germination en présence d'auxine

Dans le but d'analyser les réponses à l'auxine des plantes transgéniques, les graines issues de ces plantes ont été mises à germer sur milieu MS20 contenant différentes concentrations d'auxine. Nous avons utilisé les analogues, NAA à des concentrations de 5 $\mu$ M à 25 $\mu$ M et 2,4D à des concentrations de 2,5 $\mu$ M à 25 $\mu$ M.

Les graines issues des plantes 35S-ORF8-11 ont montré une résistance marquée ou une insensibilité vis à vis du NAA à la fois au cours de la germination et du développement post-germinal. La diminution de la quantité de graines germées en fonction de la croissance de concentration de NAA était moins prononcée chez les plantules 35S-ORF8-11 par rapport aux graines de plantes de tabac non transformées, comme représenté dans la Figure 22A. Le nombre de graines en germination et le développement post-germinal apparaît intermédiaire chez les plantules pro8-ORF8-6 (Figure 22B). Cette résistance a également été observée lorsque des graines issues d'autres lignées transgéniques 35S-ORF8, ont été mises à germer sur milieu MS additionné de NAA (10 et 20 $\mu$ M, Tableau 15). Lorsque le 2,4D était utilisé, nous avons pu observer des effets similaires à ceux produits par le NAA, quoique plus faibles. Nous pouvons conclure de cela que les graines transgéniques présentent une résistance à l'auxine au cours de leur germination et de leur développement post-germinal.

Lorsque les plantules transgéniques 35S-ORF8-11 ont été transférées du milieu MS contenant du NAA à un milieu MS sans hormone, leur développement fut plus important, comparé à celui des contrôles, alors que les plantules pro8-ORF8-6 présentaient un développement intermédiaire, entre celui des 35S-ORF8 et du type sauvage. Lemcke et Schmülling (1998b) et Lemcke *et al.* (2000), ont décrit la résistance ou l'insensibilité aux hormones (auxine et cytokinine) de plantules de tabac transformées par le gène 35S-ORF8 de la souche HRI (similaire de A4).



**Figure 22** : Germination des graines de tabac transgénique et sauvage en présence d'auxine.

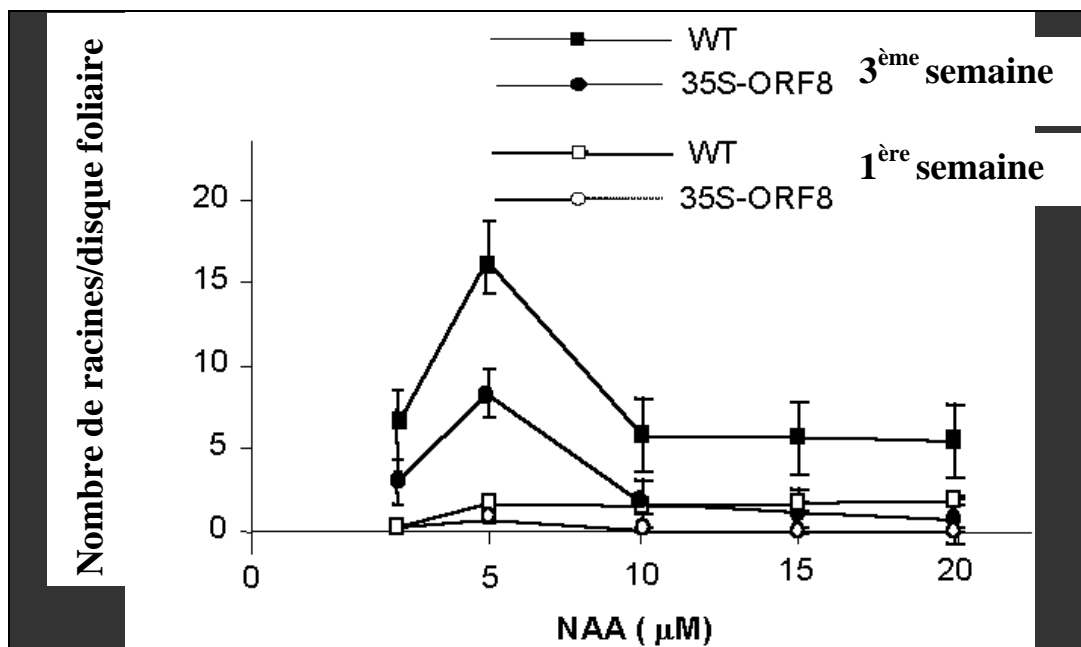
**A-** effets de l'auxine (NAA) sur la germination des graines transgéniques 35S-ORF8 et des graines sauvages de *N. tabacum* L. cv xanthi après 5 semaines. L'expérience a été réalisée sur 4 boîtes de Pétri contenant chacune 25 graines et répétée au moins 3 fois,  $\pm$  l'écart-type.

**B-** croissance des graines transgéniques 35S-ORF8 et pro8-ORF8 ainsi que des graines de tabacs sauvages, sur milieu MS additionné de 5 $\mu\text{M}$  de NAA, après 5 semaines. Les germinations 35S-ORF8 (a) montrent une plus forte croissance que celle des germinations sauvages (b) alors que les graines pro8-ORF8 (c) ont un développement intermédiaire.

**Tableau 15** : Pourcentage de graines issues d'autres lignées transgéniques (pro8-ORF8 ; 35S-ORF8) ayant germé sur milieu MS additionné de 10 et 20 $\mu$ M de NAA.

	lignée	NAA ( $\mu$ M)	
		10	20
<b>N</b>	xanthi	58%	6%
<b>Pro8-ORF8</b>	7	64%	16%
<b>35S-ORF8</b>	4	nd *	30%
	5	nd	28%
	8	nd	34%
	10	80%	50%

\* nd : non déterminé



**Figure 23** : Nombre de racines par disque foliaire de plantes transgéniques 35S-ORF8 et de plantes de tabac sauvages en présence de différentes concentrations de NAA après la première et la troisième semaine d'incubation. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 6 échantillons.

### 2.1.2. Induction par l'auxine de la rhizogénèse sur disques foliaires

Sachant que l'une des caractéristiques de l'auxine est d'induire la formation de racines, nous avons étudié la capacité de l'ORF8 de pRi2659 à induire des racines sur disques foliaires. Des disques foliaires ont été placés sur milieu MS20 supplémenté par différentes concentrations de NAA. La figure 23 montre le nombre de racines par disque foliaire en fonction des concentrations croissantes de NAA. L'induction racinaire était réduite de moitié pour les disques foliaires transgéniques 35S-ORF8. La concentration d'auxine, donnant cet effet est de 5 $\mu$ M à la 3<sup>ème</sup> semaine, indiquant que les disques foliaires 35S-ORF8 sont moins sensibles à l'application d'auxine exogène.

La formation des racines dépend à la fois de la fréquence de l'initiation racinaire et des possibles interactions positives ou négatives entre la formation des racines à différents sites d'un disque donné. Pour tester si ce faible nombre de racines des transgéniques était dû à des interactions négatives entre les centres racinaires, nous avons appliqué le test de variance statistique sur les données obtenues avec les disques foliaires incubés sur le milieu MS additionné de 1 $\mu$ M de NAA. Ce test compare la distribution observée de racines par disque avec la distribution prédite par loi de distribution de Poisson. Pour les deux génotypes, la variance était plus grande que la valeur moyenne, avec un rapport de 3,03 et 2,41 pour le sauvage et le 35S-ORF8, respectivement. Ceci indique que dans les 2 cas, l'initiation racinaire influence positivement la formation des racines.

A la 3<sup>ème</sup> semaine les racines du transgénique étaient grosses et sans ramifications, alors que les racines type sauvage étaient fines et présentaient de longues ramifications. De plus, au delà de la 3<sup>ème</sup> semaine, les disques foliaires 35S-ORF8 développaient des cals plus larges que les contrôles

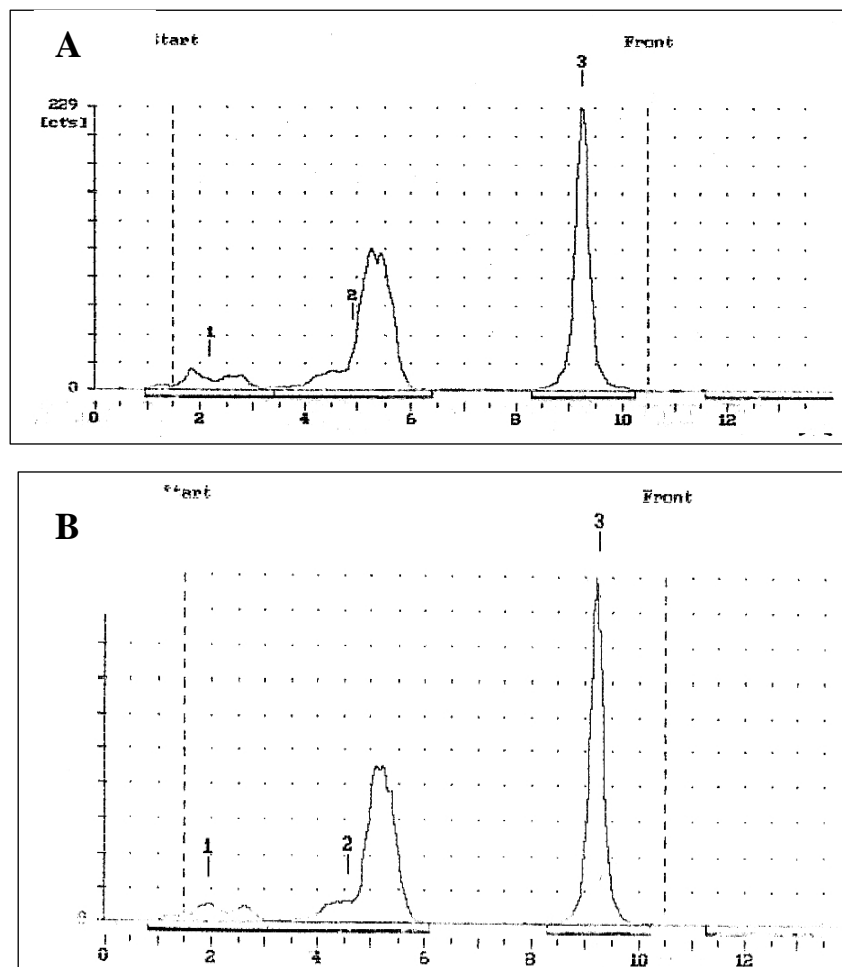
## 2.2. Métabolisme du NAA

La résistance à l'auxine observée précédemment (§ 2.1.1 et 2.1.2), nous a amenés à postuler que les plantules transgéniques étaient probablement capables de détoxifier le milieu grâce à une incorporation ou à un métabolisme différent du NAA.

Pour vérifier ceci, l'étude de l'incorporation et l'analyse du métabolisme du NAA marqué au tritium de plantules transgéniques 35S-ORF8 de 12 jours a été réalisée.

Les résultats obtenus n'ont révélé aucune différence entre les plantules transgéniques 35S-ORF8 et le contrôle aussi bien concernant la vitesse d'incorporation de l'auxine que ses composés dérivés.

La Figure 24 représente les profils des dérivés métaboliques du NAA chez les plantules 35S-ORF8 et les plantules de tabac non transformées. Ces profils sont tout à fait identiques.



**Figure 24** : Profils des dérivés métaboliques du NAA ( $H^3$ ) chez les plantules de tabac 35S-ORF8 (A) et les plantules non transformées (B).

### 3. Expression et inductibilité du promoteur de l'ORF8

#### 3.1. Activité GUS

##### 3.1.1. Spécificité tissulaire de l'expression

Nous avons analysé l'expression de l'activité GUS dans les différents organes des plantes de tabac transformées par le plasmide pJB8-GUS : racines, tiges, feuilles et fleurs.

Les valeurs observées pour les différents organes de la plante, de l'activité GUS sont assez faibles, à la limite de la détection. Le Tableau 16 donne les résultats obtenus uniquement pour les racines et les feuilles issues de 9 plantules transgéniques. Nous pouvons remarquer que cette activité est légèrement plus élevée dans les racines que dans la partie aérienne de la plante.

**Tableau 16 :** Activité GUS au niveau des feuilles et des racines de 9 plantes de tabac transgéniques pro8-GUS. La plante transformée par le pRiA4 a servi de témoin.

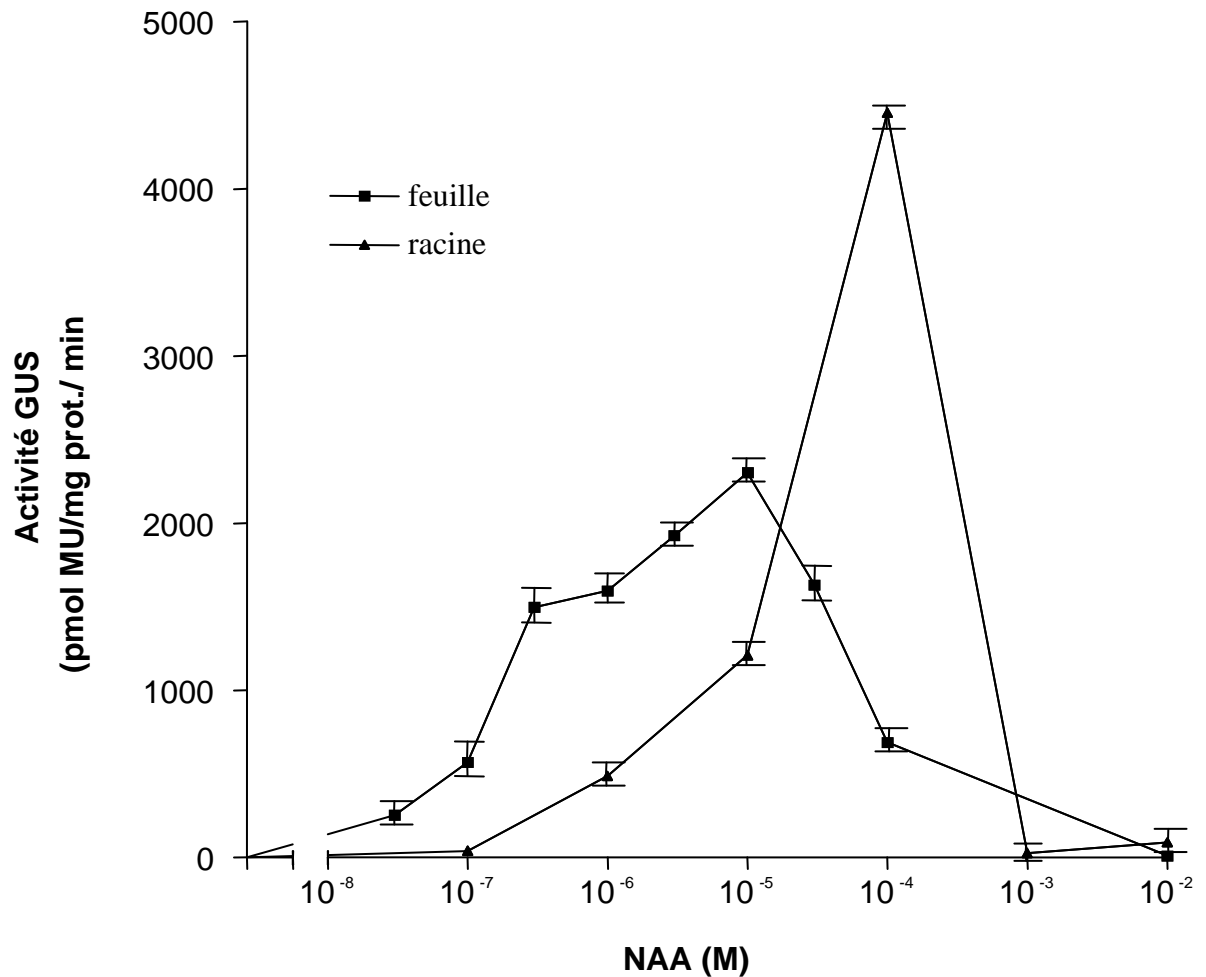
Plantes pro8-GUS	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5	N°6	N°7	N°8	N°9	Plante RiA4
Feuilles	3*	4	8	6	11	6	4	7	4	18
Racines	286	270	55	29	91	30	10	13	38	4

\* exprimée en pMole de Mu, par mg de protéine, par minute.

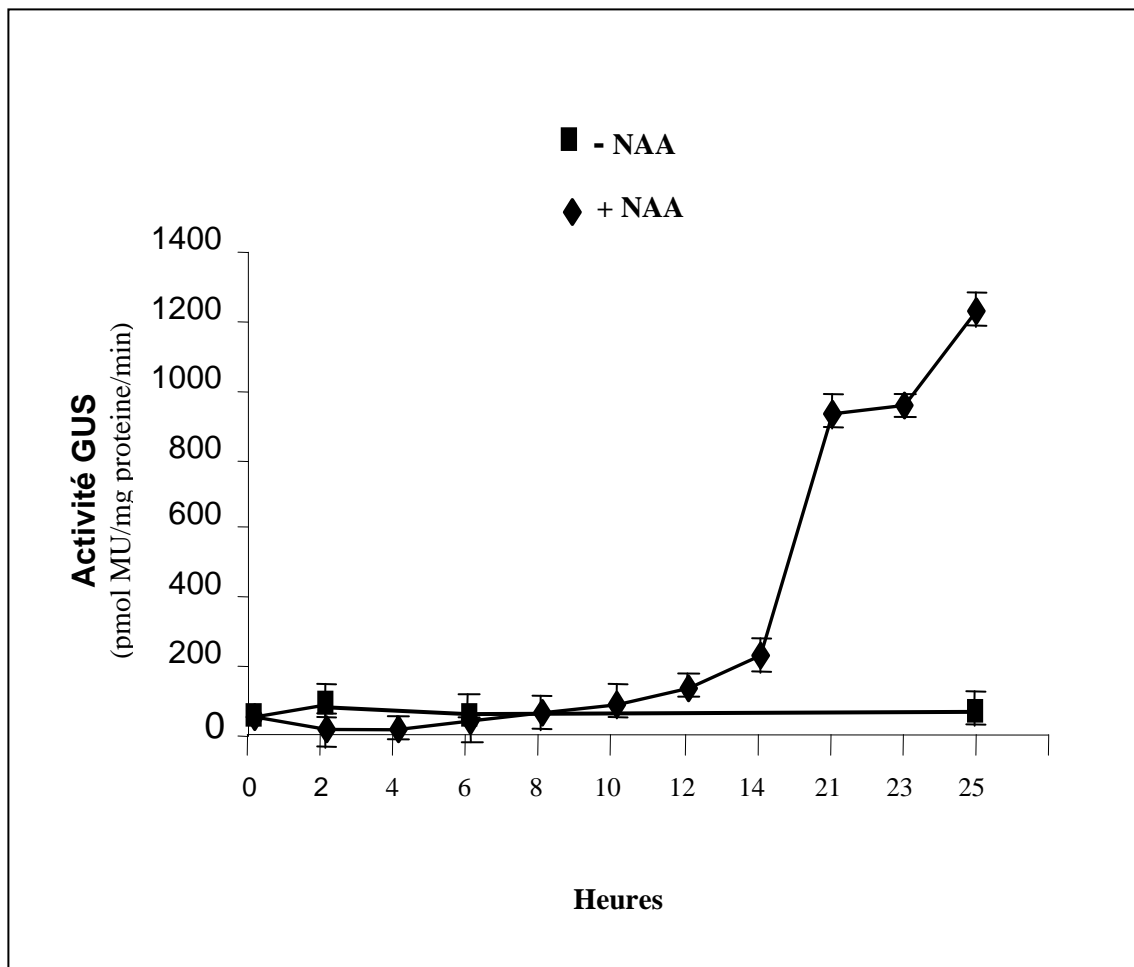
### 3.1.2. Activation du promoteur de l'ORF8 par l'auxine

L'activité GUS de disques foliaires et de racines issus de plantules pro8-GUS transformées, a été recherchée après 24 heures d'incubation dans le milieu MS additionné de différentes concentrations de NAA ( $10^{-8}$  à  $10^{-2}$ M). Nous avons constaté une augmentation de l'activité GUS avec un optimum à  $10\mu\text{M}$  de NAA dans les feuilles et à  $100\mu\text{M}$  dans les racines (Figure 25).

L'induction de l'activité du promoteur à une concentration de  $10\mu\text{M}$  en fonction du temps montre une latence d'environ 5 à 8 heures après addition d'auxine (Figure 26).



**Figure 25** : Effets de la concentration d'auxine (NAA) sur l'activité GUS de plantes de tabac pro8-GUS. L'activité GUS exprimée en pMole de MU/mg de protéine / minute a été mesurée dans les feuilles et les racines après 24heures d'incubation aux concentrations indiquées. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 à 4 échantillons de chaque type d'organes.



**Figure 26** : Mesure de l'activité GUS de feuilles de tabac transgéniques pro8-GUS en fonction du temps ; les disques foliaires ont été incubés en présence de 10  $\mu$ M de NAA. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 à 4 échantillons.

D'autre part, la cytokinine (6-BAP) n'a eu aucun effet sur l'activité du promoteur. Le Tableau 17 indique les résultats obtenus avec des feuilles de 2 plantules transgéniques pro8-GUS A et B, en présence de 10 $\mu$ M de NAA et de 10 $\mu$ M de 6-BAP, après 24heures d'incubation.

**Tableau 17:** Activité GUS au niveau des feuilles de plantes pro8-GUS (A et B) en présence de NAA et de 6BAP à une concentration de 10 $\mu$ M après 24h d'incubation.

Milieu	MS20	MS20 + NAA (10 $\mu$ M)	MS20 + 6BAP (10 $\mu$ M)
Plantes pro8-GUS <b>A</b>	28*	868	51
<b>B</b>	140	3487	215

\*exprimée en pMole de Mu, par mg de protéine, par minute.

## Chapitre IV

### DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux relations de l'ORF8 de pRi2659, avec les hormones et plus particulièrement à l'auxine.

Le T-DNA de pRi2659 de la souche à cucumopine, constitué d'une seule partie, ne porte pas de gènes *aux* contrairement au T-DNA des plasmides à agropine, mais montre une grande homologie de structure avec le TL T-DNA de pRiA4 et le T-DNA du pRi8196 (Brevet et Tempé, 1988). Les ORFs essentiels (10, 11, 12) pour l'induction du hairy root chez les 3 souches d'*Agrobacterium rhizogenes* ne montrent aucune homologie avec des gènes responsables de la biosynthèse de l'auxine et sont peu conservés contrairement à l'ORF8. En effet, ce cadre de lecture ouvert l'ORF8, est un des gènes les mieux conservés parmi les 3 différents T-DNA d'*A. rhizogenes*, indiquant une faible divergence génétique de cette région du T-DNA (voir chapitre I, Figure14). Ce gène ayant moins évolué que les oncogènes (*rol*), nous avons émis l'hypothèse qu'il devait jouer un rôle important dans l'induction du syndrome du hairy root dans son contexte naturel, conduisant à une contrainte forte sur l'évolution de cette séquence.

De plus, l'étude de la comparaison des séquences d'acides aminés déduites de la séquence nucléotidique, suggère que le produit de l'ORF8 pourrait être impliqué dans des effets liés à l'auxine, car ce produit présente des homologies faibles mais significatives (Levesque *et al.*, 1988) avec : (a) la protéine Tms1 codée par le gène *tms1* du T-DNA d'*A. tumefaciens*, responsable de la synthèse de l'indole-3-acétamide (IAM), un précurseur de l'auxine ; (b) le produit de *rol B* d'*A. rhizogenes* ; et (c) de la protéine prédite codée par le gène 5 du T-DNA d'*A. tumefaciens* qui catalyse la conversion du tryptophane en indole-3-acide lactique (IAL), un analogue de l'auxine. Le Tableau 18 résume les homologies de la protéine ORF8 (pORF8) de pRi2659 avec les séquences de RolB, du produit du gène 5 et de Tms1. La protéine ORF8 a une structure particulière, et est probablement une protéine de fusion naturelle comportant 2 domaines. Comme mentionné dans le chapitre I, la protéine ORF8 appartient à la famille des protéines appelée RolB-like (Otten et Schmidt, 1998).

**Tableau 18** : Homologies de pORF8 de pRi2659 avec Tms1, RolB et le produit du gène 5.

<b>pORF8 (pRi2659)</b>	<b>Domaine N-terminal</b>		<b>Domaine C-terminal</b>
	<b>RolB (2659) produit du gène 5 (Ach5)</b>		<b>Tms1</b>
% de similarité	38,19	34,83	42,60
% d'identité	30,90	19,10	31,95

## 1- Phénotype des plantes pro8-ORF8 et 35S-ORF8

Comme décrit dans l'introduction générale, la présence ou l'absence de l'ORF8 n'est pas associée à des changements majeurs du phénotype, même lorsque ce gène est présent et transcrit (voir Chapitre I), contrairement aux plantes qui expriment les gènes de l'ensemble du T-DNA, ou de *rolC* ou de la partie *rolB*-like de l'ORF8, qui présentent des phénotypes anormaux (Tepfer, 1984 ; Schmülling *et al.*, 1988 ; Otten et Helfer, 2001)

Dans notre étude, les plantes adultes de tabac transgéniques ont montré un développement et un phénotype tout à fait normal. Par contre, les graines de plantes de tabac transformées par l'ORF8 de pRi2659 (placé sous le contrôle de son propre promoteur ou de celui du 35S) montrent une forme de cotylédons plus allongée et pointue au cours des 2 premières semaines de développement par rapport au type sauvage. (Figure 20).

L'existence de plusieurs gènes provoquant des altérations de la forme des cotylédons appelés « pointed cotyledons HDZip genes », a été décrite chez *Arabidopsis thaliana*. Ces gènes codent des protéines HoméoDomaines leucine Zipper (HDZip) qui sont des facteurs de transcription apparemment uniques aux plantes (Hanson, 2000). Cependant, la protéine prédite ORF8 ne ressemble pas aux protéines leucine zipper.

Par ailleurs, la réduction de la largeur des cotylédons a été décrite comme un phénomène dépendant des sucres (Johannesson, 2000). De plus, Otten et Helfer (2001) ont rapporté l'existence de quantités importantes d'amidon au niveau des feuilles de tabac qui surexpriment le domaine N-terminal de l'ORF8 de pRiA4. Dans le cas de nos expériences, nous avons également observé de nombreux grains d'amidon dans les cellules de cotylédons et de feuilles de tabac transgénique 35S-ORF8 de pRi2659 (voir Figure 21). Mais à ce stade, nos résultats qualitatifs ne permettent pas de dire si les niveaux élevés d'amidon sont liés à une

augmentation de la photosynthèse c'est-à-dire à une modification du métabolisme des sucres ou à leur transport. Néanmoins, comme proposé par Otten et Helfer (2001), ces taux de sucre élevés dans les tissus transformés pourraient être bénéfiques à *Agrobacterium* qui les utiliserait, soit directement, soit en favorisant la synthèse de certaines opines telles que l'agropine, la mannopine ou l'agrocinopine (mannityl-opines) dont la composition comprend 50% de sucre. Il a été récemment montré que l'accumulation du saccharose et de l'amidon dans les feuilles de tabac transformé par la partie N-terminale de l'ORF8 de pRiA4 sous le contrôle d'un promoteur fort (2x35S), est due à une inhibition du transport du saccharose au niveau des tissus source (Umber *et al.*, 2002). Par conséquent, une étude quantitative et approfondie sur le métabolisme des sucres mériterait d'être poursuivie avec l'ORF8 de pRi2659. Il est à noter, que parmi les gènes de la famille RolB-like, un rôle dans la régulation du métabolisme du saccharose et/ou de son transport a été attribué au gène *rolC* (Nilsson et Olsson, 1997 ; voir Chapitre I, § 4.2.2.3). De plus, le promoteur de ce gène est faiblement induit par l'auxine, dans le mésophylle de protoplastes de tabac (Maurel *et al.*, 1990) mais, il est fortement induit par le saccharose (Yokoyama *et al.*, 1994 ; Nilsson *et al.*, 1996).

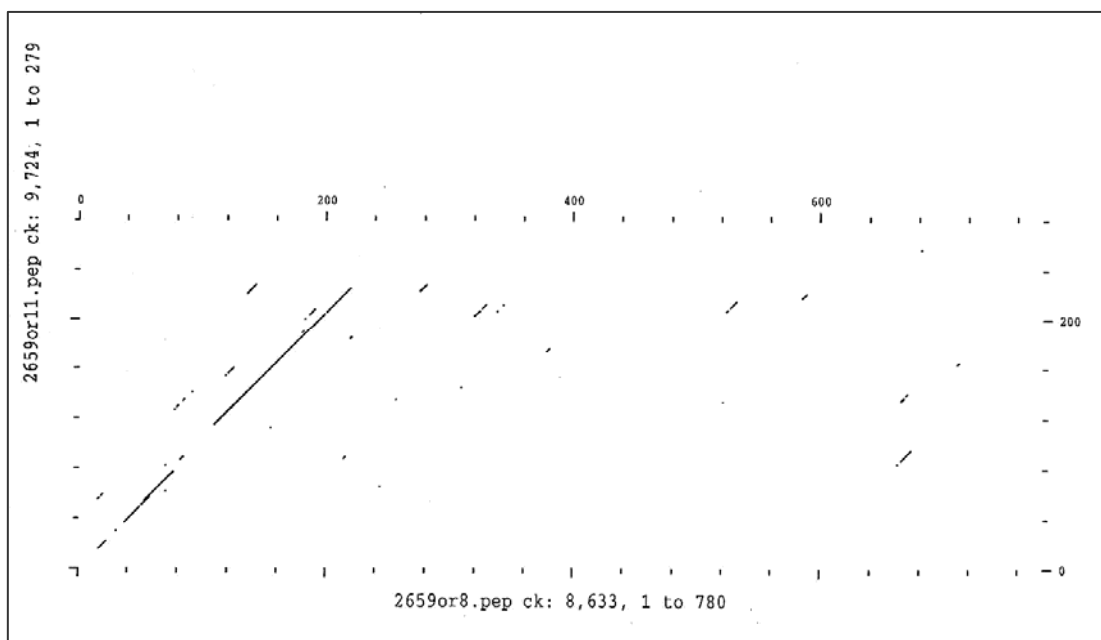
Par ailleurs, il est intéressant de remarquer que l'expression de la partie N-terminale du gène ORF8 de pRiA4 placé sous le contrôle d'un double 35S donne un phénotype particulier aux plantes de tabac obtenues (Otten et Helfer, 2001 ; Chapitre I, Tableau 8). Ces plantes présentent une taille réduite et des feuilles décolorées et nécrosées. Les auteurs rapprochent certaines de ces caractéristiques phénotypiques de celles obtenues chez les plantes de tabac exprimant le gène *rolB* ou *rolBTR* sous le contrôle du promoteur 35S (Otten et Helfer, 2001).

## 2- Résistance à l'auxine

Au cours de ce travail, nous avons montré que les graines 35S-ORF8 présentent une résistance à l'auxine à des concentrations de NAA qui sont nocives pour les graines de tabac sauvages aussi bien pendant leur germination qu'au cours de leur développement post-germinal (Figure 22a), alors que les graines pro8-ORF8 ont un comportement intermédiaire (Figure 22b). Nous avons attribué cette résistance à l'auxine, soit à une modification de l'incorporation de l'auxine exogène, soit à une modification de son métabolisme chez les plantules transgéniques. Pour tenter de répondre à cela, nous avons étudié l'incorporation et le métabolisme du NAA chez des plantules âgées de 12 jours. Aucune différence n'a été observée chez les plantules 35S-ORF8 de pRi2659 et les plantules de tabac sauvages (Figure 24).

La résistance à l'auxine de plantes de tabac transformées par l'ORF8 de pRiA4, a également été observée et rapportée par Lemcke et Schmulling (1998b) alors que les mutants *iaaM* ne surmontaient pas cette inhibition de croissance en présence d'auxine (Lemcke et Schmulling, 1998b). Du fait, des différences des extrémités N-terminales de la protéine ORF8 de pRiA4 et de celle du produit du gène *iaaM* d'*A. tumefaciens*, ces auteurs ont proposé que cette protection contre l'auxine serait due à la partie N-terminale de l'ORF8 (Lemcke *et al.*, 2000).

Le nombre de racines issues de disques foliaires de plantes 35S-ORF8 de pRi2659 placés sur milieu MS additionné de NAA à différentes concentrations (Figure 23) indique que les plantes transgéniques sont moins sensibles à l'auxine que les plantes sauvages. Ces résultats montrent, une fois de plus, que l'ORF8 diminue la sensibilité à l'auxine. Un rôle similaire a été attribué au gène 5 d'*A. tumefaciens* (Körber *et al.*, 1991) qui présente une homologie (19,10% d'identité) avec la partie N-terminale de la protéine ORF8 (Tableau17). En revanche, le gène *rolB* qui présente une homologie avec le domaine N-terminal (30,90% d'identité) (Figure27, ci-dessous) de la protéine ORF8 de pRi2659, est connu pour augmenter la sensibilité à l'auxine (Maurel *et al.*, 1991). Umber *et al.* (2002) rapportent que la partie N-terminale de l'ORF8 de pRiA4 (2x35S-A4-N-ORF8) augmente la sensibilité des plantules de tabac transformé lorsqu'elles



**Figure 27 :** Comparaison graphique des séquences protéiques entre le peptide ORF8 de pRi2659 (séquence horizontale) et le peptide RolB de pRi2659 (séquence verticale). Le programme DOTPLOT a été utilisé.

sont placées dans un milieu contenant du NAA. Ces résultats contradictoires suggèrent que lorsque le gène ORF8 est entier comme c'est le cas pour l'ORF8 de pRi2659 ou pRiA4 (ce travail ; Lemcke et Schmulling, 1998b) il y a une résistance à l'auxine alors que la partie N-terminale (RolB-like) seule, semble augmenter la sensibilité à l'auxine (Umber *et al.*, 2002)

### 3- Activité tryptophane-2-monooxygénase (T2M)

La comparaison des séquences d'acides-amino a révélé une homologie faible mais significative de l'ORF8 de pRi2659 avec le produit du gène *tms1 d'A. tumefaciens* au niveau de son extrémité C-terminale (31,95% d'identité ; Tableau 17 ; Figure 28). Dans cette partie C-terminale de la protéine ORF8, on retrouve le site de fixation du co-enzyme FAD reconnu comme motif caractéristique des tryptophane-2-monooxygénases (T2M), protéines qui catalysent la transformation du tryptophane en indole-3-acétamide.

Ce motif est également présent chez les protéines IaaM de *Pseudomonas savastanoi* et l'ORF8 de pRiA4 (Levesque *et al.*, 1988). Ceci laisse supposer l'existence d'une activité tryptophane-2-monooxygénase pour l'ORF8 de pRi2659.

Récemment, Lemcke *et al.* (2000) ont montré que la protéine codée par l'ORF8 du pRiA4 avait une faible activité tryptophane-2-monooxygénase. Les plantes de tabac qui surexpriment l'ORF8 ont une concentration 5 fois plus élevée en indole-3-acétamide, que les plantes non transformées, alors que la quantité de l'acide indole-3-acétique (AIA) était la même chez les plantes transgéniques et sauvages. Contrairement à ces auteurs, Otten et Helfer (2001) n'obtinrent pas de synthèse d'indole acétamide mesurable lorsqu'ils surexprimèrent le gène entier ORF8 de pRiA4 (2x35S-A4-ORF8) ou une fraction du gène déterminant la partie C-terminale de la protéine (2x35S-A4-CORF8) chez des plantes de tabac. De plus ce gène n'induit pas l'apparition de racines lorsqu'on coïnfecte des tiges de *Kalanchoé* avec la souche GV3101 qui possède le gène *iaaH*, provenant de la souche Ach5, gène qui convertit l'IAM en AIA (Otten et Helfer, 2001). Ces auteurs supposent que la fonction essentielle de l'ORF8 de pRiA4 ne serait pas la formation d'IAM.

Ces résultats contradictoires, ne permettent pas d'assigner une fonction précise à l'ORF8 de pRiA4. Il serait intéressant de rechercher la formation d'IAM chez les plantes de tabac transformées par l'ORF8 de pRi2659. Le T-DNA de ce plasmide ne possède pas de gènes *aux*, intervenant dans la biosynthèse de l'auxine et ne porte pas de gène *iaaH* (Combard et Baucker, 1988) au niveau de son unique T-DNA. Il est fort probable que cet ORF puisse jouer



#### 4- Expression et inductibilité de l'ORF8

Lorsque les gènes du T-DNA d'*Agrobacterium* sont transférés à la cellule végétale, ils altèrent sa morphologie et/ou ses réponses aux hormones. La plante est, également, capable de contrôler l'expression de ces gènes, en leur conférant une activité tissulaire spécifique.

Pour étudier l'expression de l'ORF8, la séquence codante du gène rapporteur *uidA* a été placée sous le contrôle du promoteur de l'ORF8. L'analyse de l'expression GUS montre que l'ORF8 est exprimé dans tous les tissus (racines, feuilles, tiges, fleurs) à très bas niveau avec toutefois des valeurs plus élevées dans les racines que dans les parties aériennes de la plante (Tableau 15).

Lorsque nous avons mesuré l'activité du promoteur de l'ORF8 après incubation à différentes concentrations de NAA, nous avons constaté une forte augmentation de l'activité avec un maximum à 10 $\mu$ M de NAA pour les feuilles et à 100 $\mu$ M pour les racines (Figure 25). L'analyse de cette induction en fonction du temps révèle une croissance de l'activité GUS avec un temps de latence compris entre 5 et 8 heures (Figure 26). Des résultats semblables ont été décrits par Maurel *et al.* (1990) pour le gène *rolB*, avec un temps de latence d'environ 5 heures, et par Körber *et al.* (1991) pour le gène 5 d'*A. tumefaciens*, avec un temps de latence allant de 9 à 12 heures. Ainsi, l'ORF8 de pRi2659 montre une cinétique plutôt lente suggérant que ce gène appartiendrait à la classe des gènes « lents » qui déterminent une réponse biologique spécifique du stimulus à l'auxine après un temps long, et non aux gènes rapidement induits par l'auxine (Abel et Theologis 1996).

Il est à noter que le promoteur de l'ORF8 et le promoteur de *rolB* ne sont pas inductibles par la cytokinine (6-BAP) alors que le gène 5 d'*A. tumefaciens* n'est inductible qu'en présence d'auxine et de cytokinine (Körber *et al.*, 1991).

L'induction par l'auxine de *rolB* a été attribuée à un facteur de transcription des plantes appartenant à la famille des protéines Dof (Baumann *et al.*, 1999). Les protéines Dof du tabac NtBBF1 sont capables de se lier au domaine B du promoteur du gène *rolB*. Le motif ACTTTA, séquence cible de NtBBF1, est l'un des éléments *cis*-régulateurs impliqués dans l'induction de *rolB* (Baumann *et al.*, 1999).

Lorsque nous avons analysé, la comparaison des séquences des promoteurs aucun motif ACTTTA n'a été trouvé au niveau des promoteurs de l'ORF8 aussi bien pour le pRi2659 que pour le pRiA4 (Tableau 19). Cependant, comparé au promoteur de l'ORF8 de pRiA4, celui de pRi2659 présente les motifs correspondant aux box I et II des gènes 5 et *rolB* qui sont régulés par l'auxine chez les plantes (Körber *et al.* 1991).

**Tableau 19:** Nombre d'éléments de séquences d'ADN communs aux promoteurs des ORFs 8, de *rolB* et du gène5.

Motifs	Promoteurs			
	ORF8 (pRi2659)	ORF8 (pRiA4)	<i>rolB</i> (pRiA4)	gène 5 (pTiAch5)
ACTTTA <sup>a</sup>	0	0	2	-
TGGCAACACAAA <sup>b</sup>	1	0	0	-
TGTCGGC (boxI)	1	0	0	1
AACATCACA (boxII)	1	0	1	1
TGTCT <sup>c</sup>	1	1	2	1

Motifs : (a) impliqué dans l'induction de *rolB* par l'auxine (Baumann *et al.*, 1999) ; (b) reconnu par RAV1 (Kagaya *et al.*, 1999) ; (c) impliqués dans la réponse à l'auxine (Ulmasov *et al.*, 1995) ; boxI et II : motifs de gènes régulés par l'auxine chez les plantes (Körber *et al.*, 1991).

Il est intéressant de remarquer que le promoteur de l'ORF8 de pRi2659 se distingue par une séquence fixant RAV1 (Related to AB13/VP1). Le motif reconnu par RAV1 est trouvé dans des régions promotrices de gènes tel que ABP (auxin binding protein) qui code une protéine qui se fixe à l'auxine (Kagaya *et al.*, 1999). Ce qui nous permet de suggérer, que les ORFs 8 de pRi2659 et de pRiA4 qui présentent tous les deux des motifs caractéristiques de la T2M, sont probablement régulés différemment dans la plante. De ce point de vue, une étude détaillée des deux promoteurs nous permettrait d'affiner notre connaissance sur cette régulation et de mieux comprendre la relation de cet ORF avec l'auxine. La comparaison de l'activité des promoteurs de l'ORF8 des souches 2659 et A4, pourrait apporter des éléments pour comprendre l'adaptation différentielle dans des conditions physiologiques distinctes de ces deux souches.

## CONCLUSION

L'ORF8 de pRi2659 code une protéine de 780 aa, et présente 81% d'homologie avec le gène ORF8 du pRiA4. Il possède au niveau de sa partie C-terminale le site de fixation du FAD, caractéristique des tryptophane-2-monooxygénases, comme l'ORF8 de pRiA4 et les gènes *tms1* et *iaaM*, alors que son domaine N-terminal confère une « résistance » à l'auxine. De plus, sa région promotrice est inductible par l'auxine, comme *rolB*.

Dans l'état actuel de nos connaissances, tous ces résultats pris ensemble, montrent la difficulté de cerner de façon précise l'apport de ce gène dans le syndrome complexe de hairy root. D'autres travaux ultérieurs sont nécessaires pour définir avec précision le rôle de l'ORF8 dans la rhizogenèse du hairy root, sachant que ce gène module et altère les réponses des cellules végétales à l'auxine.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abel, S. and Theologis A.** (1996). "Early genes and auxin action." *Plant Physiol.* **111** : 9-17.
- Akiyoshi, D.E., Amasino, R.M., Nester, E.W., and Gordon, M.P.** (1984). "T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81** : 5994-5998.
- Altamura, M.M., Archilletti, T., Capone, I., and Costantino, P.** (1991). "Histological analysis of the expression of *Agrobacterium rhizogenes rolB* GUS gene fusions in transgenic tobacco." *New Phytol.* **118** : 69-78.
- Altamura, M.M., Capitani, F., Gazza, L., Capone, I., and Costantino, P.** (1994). "The plant oncogene *rolB* stimulates the formation of flower and root meristemoids in tobacco thin cell layers." *New Phytol.* **126** : 283-293.
- Ankenbauer, RG and Nester, E.W.** (1990). "Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes: structural specificity and activities of monosaccharides." *J. Bacteriol.* **172** : 6442-6446.
- Aoyama, T., Takanami M., and Oka, A.** (1989). "Signal structure for transcriptional activation in the upstream regions of virulence genes on hairy-root-inducing plasmid A4." *Nucl. Acids Res.* **17** : 8711-8725.
- Barker, R.F., Idler K.B., Tompson D.V., and Kemp, J.D.** (1983). "Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955." *Plant Mol. Biol.* **2** : 335-350.
- Baron, C., Llosa, M., Zhou, S., and Zambryski, P.C.** (1997). "VirB1, a component of the T-complex transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens* is processed to a C-terminal secreted product VirB1\*." *J. Bacteriol.* **179** : 1203-1210.
- Barry, G.F., Rogers, S.G., Fraley, R.T., and Brand, L.** (1984). "Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 4776-4780.
- Baumann K., De Paolis A., Constantino P., and Gualberti G.** (1999). "The DNA Binding Site of the Dof Protein NtBBF1 is essential for Tissue-Specific and Auxin-Regulated Expression of the *rolB* Oncogene in Plants." *The Plant Cell* **11** (3): 323-334.
- Bellincampi, D., Cardarelli, M., Zaghi, D., Serino, G., Salvi, G., Gatz, C., Cervone, F., Altamura, M.M., Costantino, P., and De Lorenzo, G.** (1996). "Oligogalacturonides Prevent Rhizogenesis in *rolB*-Transformed Tobacco Explants by Inhibiting Auxin-Induced Expression of the *rolB* Gene." *Plant Cell* **8** : 477-487.
- Bercetche, J., Chriqui, D. Adam, S. and David C.** (1987). "Morphogenetic and cellular reorientations induced by *Agrobacterium rhizogenes* (strains 1855, 2659 and 8196) on carrot, pea and tobacco." *Plant Sci.* **52** : 195-210.

- Bergey, D.H. (1984).** "Family *Rhizobiaceae* -Genus *Agrobacterium*." Bergey's manual of Systematic Bacteriology. N.R.Krieg and J.G.Holt. Baltimore, Williams & Wilkins. **1** : 244-256.
- Bevan, M. (1984).** "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation." Nucl. Acid. Res. **12** : 8711-8721.
- Bevan, M., Barnes W.M., and Chilton M.D. (1983).** "Structure and transcription of the nopaline synthase region of T-DNA." Nucl. Acid. Res. **11** : 369-379.
- Binns, A.N., and Costantino, P. (1998).** "The *Agrobacterium* oncogenes." In The *Rhizobiaceae*. H.P. Spaink, A. Kondorosi, and P.J.J. Hooykaas, eds. (Dordrecht: Kulwer Press), pp. 251-266.
- Binns, A.N., Beaupre. C.E., and Dale, M. (1995).** "Inhibition of VirB-mediated transfer of diverse substrate from *Agrobacterium tumefaciens* by the IncQ plasmid RSF1010." J. Bacteriol. **177**: 4890-4899.
- Bishop, A. L., Burr, T. J., Mittak, V. L., and Katz, B. H. (1989).** "A monoclonal antibody specific to *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and its utilization for indexing grapevine propagation material." Phytopath. **79** : 995-998.
- Bouchez, D., and Camillieri, C. (1990).** "Identification of a putative *rolB* gene on the TR-DNA of the *Agrobacterium rhizogenes* A4 Ri plasmid." Plant Mol. Biol. **14** : 617-619.
- Bouzar, H., Jones J.B., and Hodge N.C. (1993).**"Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon-source utilization patterns and fatty acid profiles." Phytopath. **83** :733-739.
- Bradbury, J. F. (1986).** "Guide to Plant Pathogenic Bacteria." Kew. London : CAB International Mycological Institute.
- Bradford, M. M. (1976).** "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of
- Bradley L.R., Kim, J.S., and Matthyse, A.G. (1997).** "Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to Carrot Cells and *Arabidopsis* wound sites is correlated with the presence of a cell-associated acidic polysaccharide." J. Bacteriol. **179** : 5372-5379.
- Braun, A.C. (1947).** "Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown gall." Amer. J. Bot. **34** : 234-240.
- Braun, A.C., and White, P.R. (1943).** "Bacteriological sterility of tissues derived from secondary crown-gall tumors." Phytopath. **33** : 85-100.
- Bravo Angel, A.M., Hohn, B., and Tinland, B. (1998).** "The omega sequence of VirD2 is important but not essential for efficient transfer of the T-DNA by *Agrobacterium tumefaciens*." Mol. Plant-Microbe Inter. **11** : 57-63.
- Brevet, J. (2000).** GenBanck accession AJ271050.

- Brevet, J., and Tempé, J.** (1988). "Homology mapping of T-DNA regions on three *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmids by Electron Microscope Heteroduplex Studies." *Plasmid* **19** : 75-83.
- Brevet, J., Borowski, D., and Tempé, J.** (1988). "Identification of the region encoding opine synthesis and a region involved in host range on the T-DNA of cucumopine type Ri plasmid." *Mol. Plant- Microbe Inter.* **1** : 75-79.
- Broer, I., Dröge-Laser W., Barker R.F., Neumann K., Klipp W., and Pühler A.** (1995). "Identification of the *Agrobacterium tumefaciens* C58 T-DNA genes *e* and *f* and their impact on crown gall tumour formation." *Plant Mol. Biol.* **27** : 41-57.
- Buchanan-Wollasron, V., Passiatore J.E., and Cannon F.** (1987). "The *mob* and *oriT* mobilization functions of a bacterial plasmid promote its transfer to plants." *Nature* **328** : 172-175.
- Buchmann, I., Marner F.J., Schröder G., Waffenschmidt S., and Schröder J.** (1985). "Tumor genes in plants : T-DNA encoded cytokinin biosynthesis." *EMBO J.* **4** : 853-859
- Bundock, P. A., den Dulk-Ras, A., Beijerbergen, A., and Hooykaas PJJ** (1995). "Trans-kingdon T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*." *EMBO J.* **14** : 3206-3214.
- Bush, A. L., and Pueppke, S. G.** (1991). "Characterisation of an unusual *Agrobacterium tumefaciens* strain from *Chrysanthemum morifolium* Ram." *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(9) : 2468-2472.
- Camilleri C., and Jouanin L.** (1991). "The TR-DNA Region Carrying the Auxin Synthesis Genes of the *Agrobacterium rhizogenes* Agropine-Type plasmid pRi A4: Nucleotide Sequence Analysis and Introduction into Tobacco Plants." *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4** (2) : 155-162.
- Cangelosi, G.A., Ankenbauer, R.G., and Nester, E.W.** (1990). "Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 6708-6712.
- Cangelosi, G.A., Best, E.A., Martinetti, C., and Nester, E.W.** (1991). "Genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens*." *Methods in Enzymology* **145** : 177-181.
- Cangelosi, G.A., Hung, L., Puvanesarajah, V., Stacey, G., Ozga, D.A., Leigh, J.A., and Nester, E.W.** (1987). "Common loci for *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide synthesis and their role in plant interaction." *J. Bacteriol.* **169** : 2086-2091.
- Cangelosi, G.A., Martinetti G, Leigh J.A., Lee, C.C., Theines, C., and Nester, E.W.** (1989). "Role of *Agrobacterium tumefaciens* *chvA* protein in export of  $\beta$ -1,2 glucan." *J. Bacteriol.* **171** : 1609-1615.
- Capone, I., Cardarelli, M., Mariotti, D., Pomponi, M., De Paolis, A., and Costantino, P.** (1991). "Different promoter regions control level and tissue specificity of expression of *Agrobacterium rhizogenes* *rolB* gene in plants." *Plant Mol. Biol.* **16** : 427-436.

- Capone, I., Cardarelli, M., Trovato, M., and Costantino, P.** (1989a). "Upstream non-coding region which confers polar expression to Ri plasmid root inducing gene *rolB*." *Mol. Gen. Genet.* **216** : 239-244.
- Capone, I., Frugis, G., Costantino, P., and Cardarelli, M.** (1994). "Expression in different populations of cells of the root meristem is controlled by different domains of the *rolB* promoter." *Plant Mol. Biol.* **25** : 681-691.
- Capone, I., Spanò, L., Cardarelli, M., Bellicampi, A., Petit, A., and Costantino, P.** (1989b). "Induction and growth properties of carrot roots with different complements of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA." *Plant Mol. Biol.* **13** : 43-52.
- Cardarelli, M., Spanò, L., De Paolis, A., Mauro, M.L., Vitali, G., and Costantino, P.** (1985). "Identification of the genetic locus responsible for non-polar root induction by *Agrobacterium rhizogenes* 1855." *Plant Mol. Biol.* **5** : 385-391.
- Cardarelli, M., Spanò, L., Mariotti, D., Mauro, M.L., Van Sluys, M.A., and Costantino, P.** (1987). "The role of auxin in hairy root induction." *Mol. Gen. Genet.* **208** : 457-463.
- Carneiro, M., and Vilaine, F.** (1993). "Differential expression of the *rolA* plant oncogene and its effect on tobacco development." *Plant J.* **3** : 785-792.
- Chang, CH., and Winans, S.C.** (1992). "Functional roles assigned to the periplasmic, linker and receiver domains of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein." *J. Bacteriol.* **174** : 7033-7039.
- Chichiricco, G., Costantino, P., and Spano, L.** (1992). "Expression of the *rolB* oncogene from *Agrobacterium rhizogenes* during zygotic embryogenesis in tobacco." *Plant Cell Physiol.* **33** : 827-832.
- Chilton, M.-D., Drummond, M.H., Merlo, D.J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M.P., and Nester, E.W.** (1977). "Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis." *Cell* **11** : 263-271.
- Chilton, M.-D., Tepfer, D.A., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F., and Tempé, J.** (1982). "*Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of host plant root cells." *Nature* **295** : 432-434.
- Christie, P.J.** (1997). "*Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in Eubacteria." *J. Bacteriol.* **179** : 3085-3094.
- Christie, P.J.** (2001). "Type IV secretion : intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines." *Mol. Microbiol.* **40**(2) : 294-305.
- Chritie, P.J., and Vogel, J.P.** (2000). "Bacterial type IV secretion : conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells." *Trends Microbiol.* **8** : 354-360.
- Combard, A., and Baucher, M. F.** (1988). "A common organization of the T-DNA genes expressed in hairy roots induced by different plasmids of *Agrobacterium rhizogenes* ." *Plant Mol. Biol.* **10** : 499-509.

- Combard, A., Brevet, J., Borowski, D., Cam, K., and Tempé, J.** (1987). "Physical Map of the T-DNA Region of *Agrobacterium rhizogenes* Strain NCPPB2659." *Plasmid* **18** : 70-75.
- Costantino, P., Mauro, M.L., Michell, G., Risuleo, G., Hooykaas, P.J.J., and Schilperoort, R.A.** (1981). "Fingerprinting and Sequence Homology of Plasmids from Different Virulent Strains of *Agrobacterium rhizogenes*." *Plasmid* **5** : 170-182.
- Costantino, P., Spanò, L., Pomponi, M., and Ancora, G.** (1984). "T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* is transmitted to the progeny of hairy root plants." *J. Mol. Appl. Genet.* **2** : 465-470.
- Crespi, M., Messens, E., Caplan, A.B., van Montagu, M., and Desomer J.** (1992). "Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene." *EMBO J.* **11** : 795-804.
- Das, A., and Xie, Y.H.** (1998). "Construction of transposon Tn3phoA: its application in defining the membrane topology of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer proteins." *Mol. Microbiol.* **27** : 405-414.
- David, C., Chilton, M.-D., and Tempé, J.** (1984). "Conservation of T-DNA in plants regenerated from hairy root cultures." *Biotechnology* **2** : 73-76.
- Davioud, E., Kan, C., Hamon, J., Tempé, J., and Husson, H-P.** (1989). "Production of indole alkaloids by *in vitro* root cultures from *Catharanthus trichophyllus*." *Phytochem.*, **28** (10) : 2675-2680.
- Davioud, E., Petit, A., Tate, M.E., Ryder, M.H., and Tempé, J.** (1988). "Cucumopine -a new T-DNA-encoded opine in hairy root and crown gall." *Phytochem.* **27** : 2429-2433.
- De Block, M., and Debrouwer D.** (1991). "Two T-DNAs co-transformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium tumefaciens* infection are mainly integrated at the same locus." *Theor. Appl. Genet.* **82** : 257-263.
- De Cleene, M., and De Ley, J.** (1976). "The host range of crown gall." *Bot. Rev.* **47** : 147-194.
- De Greve, H., Decraemer, H., Seuring, J., van Montagu, M., and Schell, J.** (1981). "The functional organization of the octopine *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiB6S3." *J. Bacteriol.* **159** : 9-18.
- De la Riva, G.,A., Gonzàle-Cabrere,J., Vázquez-Padron and Ayra-Pardo.** (1998). "*Agrobacterium* :a natural tool for plant transformation." *Electron. J. Biotechnol.* **1** : 24-25.
- De Lajudie, P., Laurent-Fulele, E., Willems, A., Torck, U., Coopman, R., Collins, N. D., Kersters, K., Dreyfus, D., and Gillis, M.** (1998). "Description of *Allorhizobium undicola* gen. Nov., sp. Nov. For nitrogen-fixing bacteria efficiently nodulating *Neptunia natans* in Senegal." *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48** : 1277-1290.
- De Ley, J., Tijtgat, R., De Smedt, J., and Michiels, M.** (1973). "Thermal stability of DNA : DNA hybrids within the genus *Agrobacterium*." *J. Gen. Microbiol.* **78** : 241-252.
- De Paolis, A., Sabatini, S., De Pascalis, L., Costantino, P., and Capone, I.** (1996). "A *rolB* regulatory factor belongs to a new class of single zinc finger plant proteins." *Plant J.* **10** : 215-223.

- Dehio, C., and Schell, J.** (1994). "Identification of plant genetic loci involved in a post-transcriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 5538-5542.
- Dehio, C., Grossmann, K., Schell, J., and Schmülling, T.** (1993). "Phenotype and hormonal status of transgenic tobacco plants overexpressing the *rolA* gene of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA." *Plant Mol. Biol.* **23** : 1199-1210.
- Delbarre, A., Muller, P., Imhoff, V., Barbier-Brygoo, H., Maurel, C., Leblanc, N., Perrot-Rechenmann, C., and Guern, J.** (1994). "The *RoIB* Gene of *Agrobacterium rhizogenes* does not increase the auxin sensitivity of tobacco protoplasts by modifying the intracellular auxin concentration." *Plant Physiol.* **105** (2) : 563-569.
- Depicker, A., Herman, L., Jacobs, L. Shell, J., and Van Montagu, M.** (1985). "Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNAs and their relevance to the *Agrobacterium*/plant cell interaction." *Mol. Gen. Genet.* **201** :477-484.
- Dessaux, Y., Petit A., and Tempé J.** (1992). "Opines in *Agrobacterium* biology. Molecular Signals in Plant-Microbe Communications." D. P. S. Verma. Boca Raton, Florida, CRC Press pp. 109-136.
- Dessaux, Y., Petit, A., Farrand, S.K., and Murphy, P.J.** (1998). "Opines and Opine-Like Molecules Involved in Plant-*Rhizobiaceae* Interactions." In *The Rhizobiaceae*. H.P. Spaink, A. Kondorosi, and P.J.J. Hooykaas, eds. (Dordrecht: Kulwer Press), pp. 173-197.
- Doty, SL, Yu, N.C., Lundin, J.I., Heath, J.D., and Nester, E.W.** (1996). "Mutational analysis of the input domain of the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*." *J. Bacteriol.* **178** : 961-970.
- Douglas C.J., Halperin, W., and Nester, E.W.** (1982). "*Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in attachment to plant cell." *J. Bacteriol.* **152** : 1265-1275.
- Durand-Tardif, M., Broglie, R., Slightom, J.L., and Tepfer, D.** (1985). "Structure and expression of Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* in *Nicotiana tabacum*. Organ and phenotypic specificity." *J. Mol. Biol.* **186** : 557-564.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C.** (1991). "A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis." *Nucl. Acids Res.* **19** (6) : 1349-1350.
- Ellis, J.G., Murphy P.M., and Kerr A.** (1982). "Isolation and properties of transfer regulatory mutants of the nopaline-type Ti plasmid pTiC58." *Mol. Gen. Genet.* **186** : 275-281.
- Ellis, J.G., Ryder M.H., and Tate M.E.** (1984). "*Agrobacterium tumefaciens* TR-DNA encodes a pathway for agropine biosynthesis." *Mol. Gen. Genet.* **195** : 466-473.
- Estruch, J.J., Chriqui, D., Grossmann, K., Schell, J., and Spena, A.** (1991b). "The plant oncogene *rolC* is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates." *EMBO J.* **10** : 2880-2895.

- Estruch, J.J., Parets-Soler, A., Schmülling, T., and Spena, A.** (1991c). "Cytosolic localization in transgenic plants of the *rolC* peptide from *Agrobacterium rhizogenes*." *Plant Mol. Biol.* **17** : 547-550.
- Estruch, J.J., Schell, J., and Spena, A.** (1991a). "The protein encoded by the *rolB* plant oncogene hydrolyses indole glucosides." *EMBO J.* **10** : 3125-3128.
- Failla, M.C., Maimone, F., De Paolis, A., Costantino, P., and Cardarelli, M.** (1990). "The non-conserved region of cucumopine-type *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA is responsible for hairy root induction." *Plant Mol. Biol.* **15** : 747-753.
- Faiss, M., Strnad, M., Redig, P., Dolezal, K., Hanus, J., van Onckelen, H., and Schmülling, T.** (1996). "Chemically induced overexpression of the *rolC*-encoded  $\beta$ -glucosidase in transgenic plants and analysis of cytokinin metabolism: *rolC* does not hydrolyze endogenous cytokinin glucosides in *planta*." *Plant J.* **10** : 33-46.
- Filetici, P., Spanò, L., and Costantino, P.** (1987). "Conserved regions in the T-DNA of different *Agrobacterium rhizogenes* root-inducing plasmids." *Plant Mol. Biol.* **9** : 19-26.
- Filichkin, S.A., and Gelvin, S.B.** (1993). "Formation of a putative relaxation intermediate during T-DNA processing directed by *Agrobacterium tumefaciens* VirD1/D2 endonuclease." *Mol. Microbiol.* **8** : 915-926.
- Filippini, F., Rossi, V., Marin, O., Trovato, M., Costantino, P., Downey, P.M., Lo Schiavo, F., and Terzi, M.** (1996). "A plant oncogene as a phosphatase." *Nature* **379** : 499-500.
- Follin A., Inzé D., Budar F., Genetello C., van Montagu M. and Schell J.** (1985). "Genetic evidence that the tryptophan 2-mono-oxygenase gene of *Pseudomonas savastanoi* is functionally equivalent to one of the T-DNA genes involved in plant tumor formation by *Agrobacterium tumefaciens*." *Mol. Gen. Genet.* **201** : 178-185.
- Freiberg, C., Felley, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A., and Perret, X.** (1997). "Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes." *Nature* **387** :394-401.
- Frisch, D. A., Harris-Haller, L. W., Yokubaitis, N. T., Thomas, T. L., Hardin S. H., and Hall, T. C.** (1995). "Complete sequence of the binary vector Bin 19." *Plant Mol. Biol.* **27** : 405-409.
- Fründt, C., Meyer, A.D., Ichikawa, T., and Meins, F.Jr.** (1998). "A tobacco homologue of the Ri-plasmid *orf13* gene causes cell proliferation in carrot root discs." *Mol. Gen. Genet.* **259** : 559-568.
- Fusseder, A., and Ziegler, P.** (1988). "Metabolism and compartmentation of dihydrozeatin exogenously supplied by photoautotrophic suspension cultures of *Chenopodium rubrum*." *Planta* **173** : 104-109.
- Garfinkel, D.J., Simpson, R.B., Ream, L.W., White, F.F., Gordon, M.P., and Nester, E.W.** (1981). "Genetic analysis of crown gall: Fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis." *Cell* **27** : 143-153.
- Gaudin, V., Vrain T., and Jouanin L.** (1994). "Bacterial genes modifying hormonal balances in plants." *Plant Physiol. Biochem.* **32** : 11-29.

- Ghai, J., and Das, A.** (1989). "The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid encodes a DNA relaxing enzyme." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86** : 3109-3113.
- Gheysen, G., Villarroel, R., and van Montagu, M.** (1991). "Illegitimate recombination in plants : a model for T-DNA integration." Genes Dev., **5** : 287-297.
- Goldmann, A., Tempé, J., and Morel, G.** (1968). "Quelques particularités de diverses souches d'*Agrobacterium tumefaciens*." C. R. Soc. Biol. **162** : 630.
- Goodner B., and 30 others authors** (2001). "Genome Sequence of the Plant Pathogen and Biotechnology Agent *Agrobacterium tumefaciens* C58." Science **294** (5550) : 2323-2328.
- Gross, R., Arico, B., and Rappuoli, R.** (1989). "Families of bacterial signal-transducing proteins." Mol. Microbiol. **3** : 1661-1667.
- Hansen, G., Larribe, M., Vaubert, D., Tempé, J., Biermann, B.J., Montoya, A.L., Chilton, M.-D., and Brevet, J.** (1991). "*Agrobacterium rhizogenes* pRI8196 T-DNA: Mapping and DNA sequence of functions involved in mannopine synthesis and hairy root differentiation." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88** : 7763-7767.
- Hansen, G., Tempé, J., and Brevet, J.** (1992). "A T-DNA transfer stimulator sequence in the vicinity of the right border of pRI8196." Plant Mol. Biol. **20** :113-122.
- Hansen, G., Vaubert, D., Clérot, D., and Brevet, J.** (1997). "Wound-inducible and organ-specific expression of ORF13 from *Agrobacterium rhizogenes* 8196 T-DNA in transgenic tobacco plants." Mol. Gen. Genet. **254** : 337-343.
- Hansen, G., Vaubert, D., Clérot, D., Tempé, J., and Brevet, J.** (1994). "A new open reading frame, encoding a putative regulatory protein, in *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA." C. R. Acad. Sci. Paris **317** : 49-53.
- Hansen, G., Vaubert, D., Héron, J.N., Clérot, D., Tempé, J., and Brevet, J.** (1993). "Phenotypic effects of overexpression of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA ORF13 in transgenic tobacco plants are mediated by diffusable factor(s)." Plant J. **4** : 581-586.
- Hanson J.** (2000). " Functional Characterization of the Pointed Cotyledons Subclass of HDZip genes in *Arabidopsis thaliana*." Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology **580** : 56 pp. Uppsala. ISBN 91-554-4846-1.
- Hattori, Y., Uraji, M., Suziki, K., Ohta, N., Iwata, K., Katoch, A., and Yoshida, K.** (2000). "Gene list on a plant tumor-inducing plasmid, pTi-SAKURA in *Agrobacterium tumefaciens*." DNA Res. **7** : 371-380.
- Hayman, G.T., and farrand, S.K.** (1990). "*Agrobacterium* plasmids encode sructurally different loci for catabolism of agrocinopine-type opines."Mol. Gen. Genet. **263** : 465-473.
- Heinemann, J.A., and Sprague, G.F.** (1989). "Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast." Nature **340** : 205-209.

- Hemerly, A., Engler J. A., Bergounioux, C., van Montagu, M., Engler, G., Inzé, D., and Ferreira, P.** (1995). "Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development." *EMBO J.* **14** (16) : 3925-3936.
- Herrera-Estrella, A., Van Montagu, M., and Wang, K.** (1990). "A bacterial peptide acting as a plant nuclear targeting signal: the amino-terminal portion of *Agrobacterium* VirD2 protein directs the  $\beta$ -galactosidase fusion protein into tobacco nuclei." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 9534-9537.
- Hicks, G.R., Smith, H.M.S., Shieh, M., and Raikhel, N.V.** (1995). "Three Classes of Nuclear Import Signals Bind to Plant Nuclei." *Plant Physiol.* **107** : 1055-1058.
- Hildebrand, E.M.** (1934). "Life history of the hairy-root organism in relation to its pathogenesis on nursery apple trees." *J. Agric. Sci.* **48** : 857-885.
- Hille, J., Wullems, G. and Schilperoort, R.A.** (1983). "Non-oncogenic T-region mutants of *Agrobacterium tumefaciens* do transfer T-DNA into plant cells." *Plant Mol. Biol.* **2** : 155-163.
- Hooykaas, P.J.J., and Schilperoort, R.A.** (1992). "*Agrobacterium* and plant genetic engineering." *Plant Mol. Biol.* **19** : 15-38.
- Hooykaas, P.J.J., den Dulk-Ras, H., and Schilperoort, R.A.** (1988). "The *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA gene *6b* is an *onc* gene." *Plant Mol. Biol.* **11** : 791-794.
- Hooykaas, P.J.J., Hofker, M. Den Dulk-Ras, H., and Schilperoort, R. A.** (1984). "A comparison of virulence determinants in an octopine Ti plasmid, a nopaline Ti plasmid, and a Ri plasmid complementation analysis of *Agrobacterium tumefaciens* mutants." *Plasmid* **11** : 195-205.
- Horsch, R.B., Fry J.E., Hoffmann N., Eichholtz D., Rogers S.G., and Fraley R.T.** (1985). "A simple and general method for transferring genes into plants." *Science* **227** : 1229-1231.
- Huang, Y., Morel, P., Powell, B. and Kado, C.I.** (1990). "VirA, a coregulator of Ti-specified virulence genes, is phosphorylated *in vitro*." *J. Bacteriol.* **172** : 1142-1144.
- Huffman, G. A., White, F. F., and Nester, E. W.** (1984). "Hairy root inducing plasmid : Physical map and homology to tumor-inducing plasmids." *J. Bacteriol.* **157** : 269-276.
- Inzé, D., Van Lijsebettens, M., Simoens, C., Genetello, C., van Montagu, M., and Schell, J.** (1984). "Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*; further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis." *Mol. Gen. Genet.* **194** :265-274.
- Isogai, A., Fukuchi, N., Hayashi, M., Kamada, H., Harada, H., and Suzuki, A.** (1990). "Mikimopine, an opine in hairy roots of tobacco induced by *Agrobacterium rhizogenes*." *Phytochem.* **29** : 3131-3134.
- Iuchi, S.** (1993). "Phosphorylation/dephosphorylation of the receiver module at the conserved aspartate residue controls transphosphorylation activity of histidine kinase in sensor protein ArcB of *Escherichia coli*." *J. Biol. Chem.* **268** : 23972-23980.

- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., and Bevan M.W.** (1987). "GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants." *EMBO J.* **6** : 3901-3907.
- Jen,G.C., and Chilton M.D.** (1986). "The right border of pTiT37 T-DNA is intrinsically more active than the left border region in promoting T-DNA transformation." *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **83** : 3895-3899.
- Jin, S., Prusti, R.K., Roitsch, T., Ankenbauer, R.G., and Nester, E.W.** (1990a). "The VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* is phosphorylated by the autophosphorylated VirA protein and this is essential for its biological activity." *J. Bacteriol.* **172** : 4945-4950.
- Jin, S., Roitsch, T., Christie, P.J., and Nester, E.W.** (1990b). "The regulatory VirG protein specifically binds to a *cis* acting regulatory sequence involved in transcriptional activation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes." *J. Bacteriol.* **172** : 531-562.
- Jin, S., Song, Y., Pan, S., and Nester, E.W.** (1993). "Characterization of a *virG* mutation that confers constitutive virulence gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*." *Mol. Microbiol.* **7** : 555-562.
- Johannesson, H.** (2000). "Functional Analysis of Homeodomain-Leucine Zipper Transcription Factors in *Arabidopsis thaliana*." *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Dissertations from the Faculty of Science and Technology* **569**, 44 pp. Uppsala. ISBN 91-554-4816-X.
- Joos, H., Inzé D.,Caplan A., Sormann M., Van Montagu M., and Schell J.** (1983). "Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline crown gall." *Cell* **32** : 1057-1067.
- Jouanin, L.** (1984). "Restriction map for agropine-type plasmid and its homologues with Ti pasmids." *Plasmid* **12** : 91-102.
- Jouanin, L., Guerche, P., Pamboukdjian N., Tourneur, C., Casse-Delbart, F., and Tourneur, J.** (1987). "Structure of T-DNA in plants regenerated from roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* strain A4." *Mol. Gen. Genet.* **206** : 387-392.
- Kagaya Y., Ohmiya K., and Hattori T.** (1999). "RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants." *Nucl. Acids Res.* **27** (2) : 470-478.
- Kanemoto, R.H., Powell, A.T., Akiyoshi, D.E., Regier, D.A., Kerstetter, R.A., Nester, E.W., Hawes, M.C., and Gordon, M.P.** (1989). "Nucleotide sequence and analysis of the plant-inducible locus *pinF* from *Agrobacterium tumefaciens*." *J. Bacteriol.* **171** : 2506-2512.
- Kawasaki, E.S.** (1990). "Amplification of RNA." in : *PCR Protocols- A guide to Methods and applications*. Ed. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., and White T.J. Academic Press, INC, pp:21-27.
- Keane, P.J., Kerr, A., and New, R.B.** (1970). "Crown gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates." *Aust. J. Biol. Sci.* **23** : 585-595.

- Kerr, A.** (1969). "Transfer of virulence between isolates of *Agrobacterium*." *Nature* **223** : 1175-1176.
- Kerr, A.** (1992). "The genus *Agrobacterium*." In *The Protokaryotes*, 2<sup>nd</sup> edn Ed. by A. Balows, H. G. Tüper, M. Dworkins, W. Harder et K. H. Schleifer. Heidelberg : Springer. pp : 2214-2235
- Kerr, A., and Panagopoulos, C.G.** (1977). "Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control." *Phytopathol. Z.* **90** : 172-179.
- Kerstens, K., and De Ley J.** (1975). "Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns." *J. Gen. Microbiol.* **87** : 333-342.
- Kerstens, K., and De Ley J.** (1984). "Genus *Agrobacterium*- Bergey's manual of Systematic Bacteriology." Baltimore, Williams and Wilkins, pp?
- Kerstens, K., De Ley J., Sneath, P. H. A., and Sackin, M.** (1973). "Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium* ." *J. Gen. Microbiol.* **78** : 227-239.
- Kiyokawa, S., Kobayashi, K., Kikuchi, Y., Kamada, H., and Harada, H.** (1994). "Root-inducing region of Mikimopine type Ri plasmid pRi1724." *Plant Physiol.* **104** :801-802.
- Klee H.J., Horsch R.B., Hinchee M.A., Hein M.B., and Hoffmann N.L.** (1987). " The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants." *Genes Dev.* **1**: 86-96.
- Koncz, C., and Schell, J.** (1986). "The promoteur of TR-DNA gene 5 contols the tissue specific expression of chimeric genes carried by novel type of *Agrobacterium* binary vector." *Mol. Gen. Genet.* **204** : 383-396.
- Körber H., Strizhov N., Staiger D., Feldwish J., Olsson O., Sandberg G., Palme K., Schell J., and Koncz C.** (1991). "T-DNA gene 5 of *Agrobacterium* modulates auxin response by autoregulated synthesis of a growth hormone antagonist in plants." *EMBO J.* **10** (13) : 3983-3991.
- Kuldau, G.A., DeVos, G., Owen, J., McGaffrey, G., and Zambryski, P.** (1990). "The *virB* operon of *Agrobacterium tumefaciens* pTiC58 encodes 11 open reading frames." *Mol. Gen. Genet.* **221** : 256-266.
- Leach, F., and Aoyagi, K.** (1991). "Promoter analysis of the highly expressed *rolC* and *rolD* root-inducing genes of *Agrobacterium rhizogenes*: enhancer and tissue-specific DNA determinants are dissociated." *Plant Sci.* **79** : 69-76.
- Leemans, J., Deblaere, R., Willmitzer, L., De Greve, H., Hernasteens, J.P., van Montagu, M., and Shell J.** (1982). "Genetic identification of fonctions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls." *EMBO J.* **1** : 147-152.
- Lemcke K., Prinsen E., van Onckelen H., and Schmülling T.** (2000). "The ORF8 Gene Product of *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA has Tryptophan 2-Monooxygenase Activity." *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13** (7) : 787-790.

- Lemcke, K., and Schmülling, T.** (1998a). "A putative *rolB* homolog of the *Agrobacterium rhizogenes* TR-DNA has different morphogenic activity in tobacco than *rolB*." *Plant Mol. Biol.* **36** : 803-808.
- Lemcke, K., and Schmülling, T.** (1998b). "Gain of function assays identify non-*rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA that alter plant morphogenesis or hormone sensitivity." *Plant J.* **15** : 423-433.
- Lessi, M., and Lanka, E.** (1994). "Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells." *Cell* **77** : 321-324.
- Lessi, M., Balzer, D., Pansegrau, W., and Lanka, E.** (1992). "Sequence similarities between the RP4 Tra2 and the Ti VirB region strongly support the conjugation model for T-DNA transfer." *J. Biol. Chem.* **267** : 20471-20480.
- Levesque, H., Delepelaire, P., Rouzé, P., Slightom, J., and Tepfer, D.** (1988). "Common evolutionary origin of the central portions of the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* and the Ti T-DNAs of *Agrobacterium tumefaciens*." *Plant Mol. Biol.* **11** : 731-744.
- Limami M.A., Sun, L.Y., Douat, C., Helgeson, J., and Tepfer, D.,** (1998). "Natural Genetic Transformation by *Agrobacterium rhizogenes*." *Plant Physiol.* **118** : 543-550.
- Lin, T.S., and Kado, C.I.** (1993). "The *virD4* gene is required for virulence while *virD3* and *orf5* are not required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*." *Mol. Microbiol.* **9** : 803-812.
- Magrelli, A., Langenkemper, K., Dehio, C., Schell, J., and Spena, A.** (1994). "Splicing of the *rolA* transcript of *Agrobacterium rhizogenes* in *Arabidopsis*." *Science* **266** : 1986-1988.
- Maizel, J.V., and Lenk, R.P.** (1981). "Enhanced Graphic Matrix Analysis of Nucleic Acid and Protein sequences." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78** : 7665-7669.
- Matthysse A.G.** (1987). "Characterization of non attaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens*." *J.Bacteriol.* **169** : 313-323.
- Matthysse, A.G.** (1983). "Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection." *J.Bacteriol.* **154** : 906-915.
- Matthysse, A.G.** (1986). "Initial interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells." *Crit. Rev. Microbiol.* **13** : 281-307.
- Matthysse, A.G., and Mc Mahan S.** (1998). "Root colonization by *Agrobacterium tumefaciens* is reduced in *cel*, *attB*, *attD*, and *attR* mutants." *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 2341-2345.
- Matthysse, A.G., Yarnall, H.A., and Young, N.** (1996). "Requirement for genes with homology to ABC transport system for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*." *J. Bacteriol.* **178** : 5302-5308.

- Maurel, C., Barbier-Brygoo, H., Spena, A., Tempé, J., and Guern, J.** (1991). "Single *rol* genes from the *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA alter some of the cellular responses to auxin in *Nicotiana tabacum*." *Plant Physiol.* **97** : 212-216.
- Maurel, C., Brevet, J., Barbier-Brygoo, H., Guern, J., and Tempé, J.** (1990). "Auxin regulates the promoter of the root-inducing *rolB* gene of *Agrobacterium rhizogenes* in transgenic tobacco." *Mol. Gen. Genet.* **223** : 58-64.
- Maurel, C., Leblanc, N., Barbier-Brygoo, H., Perrot-Rechenmann, C., Bouvier-Durand, M., and Guern, J.** (1994). "Alterations of auxin perception in *rolB*-transformed tobacco protoplasts." *Plant Physiol.* **105** :1209-1215.
- Mauro, M.L., Trovato M., Paolis A.D., Gallelli A., Costantino P., and Altamura M.M.** (1996). "The plant oncogene *rolD* stimulates flowering in transgenic tobacco plants." *Dev. Biol.* **180** : 693-700.
- Medford, J.I., Horgan, R., El-Sawi, Z., and Klee, H.J.** (1989). "Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene." *Plant Cell* **1** : 403-413.
- Meyer, A.D., Ichikawa, T., and Meins, F.Jr.** (1995). "Horizontal gene transfer: Regulated expression of a Tobacco Homologue of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene." *Mol.Gen.Genet.* **249** : 265-273.
- Meyer, A.D., Tempé, J., and Costantino, P.** (2000). "Hairy root : a molecular overview. Functional analyses of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes." *Mol.Plant-Microbe Interact.* **5** : 93-139.
- Moore, L., Guylyn, W., and Strobel, G.** (1979). "Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*." *Plasmid* **2** : 617-626.
- Moriguchi, K., Maeda Y., Satou M., Hardayani N.S.N., Kataoka M., Tanaka N., and Yoshida K.** (2001). "The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in *Rhizobiaceae*." *J. Mol. Biol.* **307** : 771-784.
- Moritz, T., and Schmülling, T.** (1998). "The gibberellin content of *rolA* transgenic tobacco plants is specifically altered." *J. Plant Physiol.*
- Murashige T., and Skoog F.** (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures." *Physiol Plant.* **15** : 473-497.
- Nester, E.W., Gordon, M.P., Amasino, R.M., and Yanofsky, M.F.** 1984). "Crown gall: a molecular and physiological analysis." *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**: 387-413
- Nilsson, O. and Olsson, O.** (1997). "Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of hairy roots." *Physiol. Plant.* **100** : 463-473.

- Nilsson, O., Crozier, A., Schmülling, T., Sandberg, G., and Olsson, O.** (1993a). "Indole-3-acetic acid homeostasis in transgenic tobacco plants expressing the *Agrobacterium rhizogenes rolB* gene." *Plant J.* **3** : 681-689.
- Nilsson, O., Little, C.H.A., Sandberg, G., and Olsson, O.** (1996). "Expression of two heterologous promoters, *Agrobacterium rhizogenes rolC* and cauliflower mosaic virus 35S, in the stem of transgenic hybrid aspen plants during the annual cycle of growth and dormancy." *Plant Mol. Biol.* **31** : 887-895.
- Nilsson, O., Moritz, T., Imbault, N., Sandberg, G., and Olsson, O.** (1993b). "Hormonal characterization of transgenic tobacco plants expressing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA." *Plant Physiol.* **102** : 363-371.
- Nilsson, O., Tuominen, H., Sundberg, B., and Olsson, O.** (1997). "The *Agrobacterium rhizogenes rolB* and *rolC* promoters are expressed in pericycle cells competent to serve as root initials in transgenic hybrid aspen." *Physiol. Plant.* **100** : 456-462.
- Odell J.T., Nagy T., and Chun N.H.** (1985). "Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter." *Nature* **313** : 810-812
- Offringa, I.A., Melchers, L.S., Regensberg-Tunik, A.J.G., Costantino, P., Schilperoort, R.A., and Hooykaas, P.J.J.** (1986). "Complementation of *Agrobacterium tumefaciens* tumor inducing *aux* mutants by genes from the TR-region of the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** : 6935-6939.
- Okamoto, S., Toyoda-Yamamoto, A., Ito, K., Takebe, I., and Machida, Y.** (1991). "Localization and orientation of the VirD4 protein of *Agrobacterium tumefaciens* in cell membrane." *Mol. Gen. Genet.* **228** : 24-32.
- Ooms G., Hooykaas P.J.J., Van Veen H.J.M., Van Beelen P., Regensburg-Tuink T.J.G. and Schilperoort R.A.** (1982). "Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region." *Plasmid* **7** : 15-29.
- Ooms, G., Hooykaas, P.J.J., Moolenaar, G., and Schilperoort, R.A.** (1981). "Crown gall plant tumors of abnormal morphology, induced by *Agrobacterium tumefaciens* carrying mutated octopine Ti plasmids; analysis of T-DNA functions." *Gene* **14** : 33.
- Ooms, G., Twell, D., Bossen, M.E., Hodge, H.C., and Burrell, M.M.** (1986). "Developmental regulation of Ri TL-DNA expression in roots, shoots and tubers of transformed potato (*Solanum tuberosum* cv. Desiree)." *Plant Mol. Biol.* **6** : 321-330.
- Oono, Y., Kanaya, K., and Uchimiya, H.** (1990). "Early flowering in transgenic tobacco plants possessing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid." *Jap. J. Genet.* **65** : 7-16.
- Oono, Y., Satomi, T., and Uchimiya, H.** (1991). "*Agrobacterium rhizogenes lacZ-rolC* gene expression in *Escherichia coli*: Detection of the product in transgenic plants using RolC-specific antibodies." *Gene* **104** : 95-98.

- Ophel, K., and Kerr A.** (1990). "Agrobacterium vitis sp. nov. for strains of Agrobacterium biovar 3 from grapevine." *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40** : 236-241.
- Otten L., and Helfer A.** (2001). "Biological Activity of the *rolB*-like 5' End of the A4-*orf8* Gene from the Agrobacterium rhizogenes TL-DNA." *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14** (3) : 405-411.
- Otten, L., and Schmidt, J.** (1998). "A T-DNA from the Agrobacterium tumefaciens Limited-Host-Range Strain AB2/73 Contains a Single Oncogene." *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11** : 335-342.
- Otten, L., Canaday, J., Gérard, J. C., Fournier, P., Crouzet, P., and Paulus, F.** (1992). "Evolution of agrobacteria and their Ti plasmids." *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5** (4) : 279-287.
- Pan, S.Q., Charles, T., Jin, S., Wu, Z.L., and Nester, E.W.** (1993). "Preformed dimeric state of the sensor protein VirA is involved in plant-Agrobacterium signal transduction." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 9939-9943.
- Pandolfini, T., Storlazzi, A., Calabria, E., Defez, R., and Spena, A.** (2000). "The sliceosomal intron of *rolA* gene of Agrobacterium rhizogenes is a prokaryotic promoter." *Mol. Microbiol.* **35**(6) :1326-1334.
- Parkinson, J.S.** (1993). "Signal transduction schemes of bacteria." *Cell* **73** : 857-871.
- Peralta, E.G., and Ream, L.W.** (1985). "T-DNA border sequence required for crown gall tumorigenesis." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 5112-5116.
- Peralta, E.G., Hellmis, R., and Ream, L.W.** (1986). "Overdrive, a T-DNA transmission enhancer on the Agrobacterium tumefaciens tumor-inducing plasmid." *EMBO J.* **5** : 1137-1142.
- Petit, A., David, C., Dahl, G.A., Ellis, J.G., Guyon, P., Casse-Delbart, F., and Tempé, J.** (1983). "Further Extension of the Opine Concept: Plasmids in Agrobacterium rhizogenes Cooperate for Opine Degradation." *Mol. Gen. Genet.* **190** : 204-214.
- Petit, A., Delhaye, S., Tempé, J., and Morel, G.** (1970). "Recherches sur les guanidines des tissus de crown gall. Mise en évidence d'une relation biochimique spécifique entre les souches d'Agrobacterium tumefaciens et les tumeurs qu'elles induisent." *Physiol. Végét.* **8** : 205-213.
- Petit, A., Tempé J., Kerr A., Holsters M., van Montagu M., and Schell J.** (1978). "Substrate induction of conjugative activity of Agrobacterium tumefaciens Ti plasmids." *Nature* **271** : 570-572
- Piers, K.L., Heath, J.D., Liang, X., Stephens, K.M., and Nester, E.W.** (1996). "Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of yeast." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** : 1613-1618.
- Pohlman, R.F., Genetti, H.D., and Winans, S.C.** (1994). "Common ancestry between IncN conjugal transfer genes and macromolecular export systems of plant and animal pathogens." *Mol. Microbiol.* **14** : 655-668.
- Ponsonnet, C., and Nesme X.** (1994). "Identification of Agrobacterium strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions." *Arch. Microbiol.* **161** : 300-309.

- Porter, J.R.** (1991). "Host Range and Implications of Plant Infection by *Agrobacterium rhizogenes*." Crit. Rev. Plant Sci. **10** : 387-421.
- Pridmore, R.D.** (1987). "New and Versatile cloning vectors with kan-resistance." Gene **56** : 309-312.
- Protein Utilizing the principle of Protein-Dye Binding." Analytical Biochem. **72** : 248-254.
- Raikhel, N.** (1992). "Nuclear targeting in plants." Plant Physiol. **100** : 1627-1632.
- Riker, A. J. , Banfield, W., Wright, W. Keitt, G., and Sagen H.** (1930). "Studies on infectious hairy root of nursery apple trees." J. Agric. Res. **41** : 507-540.
- Rogowsky, P.M., Powell, B.S., Shirasu, K., Lim, T.S., Morel, P., Zyprian, E.M., Steck, T.R., and Kado, C.I.** (1990). "Molecular characterization of the *vir* regulon of *Agrobacterium tumefaciens*: complete nucleotide sequence and gene organization of the 28.63 kbp regulon cloned as single unit." Plasmid **23** : 85-106.
- Rossi, L., Hohn, B., and Tinland, B.** (1993). "Vir D2 protein carries nuclear localization signals important to transfer of T-DNA to plants." Mol. Gen. Genet. **239** : 345-353.
- Rossi, L., Tinland, B., and Hohn, B.** (1998). "Role of Virulence Proteins of *Agrobacterium* in the Plant." In The *Rhizobiaceae*. H.P. Spaink, A. Kondorosi, and P.J.J. Hooykaas, eds. (Dordrecht: Kulwer Academic Publishers), pp. 303-320.
- Sacristan, M.D., and Melchers, G.** (1977). "Regeneration of plants from habituated *Agrobacterium* transformed single cell clones." Mol. Gen. Genet. **152** : 111-117.
- Saiki, R.K.** (1990). "The Design and Optimization of the PCR" in : PCR Protocols- A guide to Methods and applications. Ed. Innis M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. Academic Press, INC, pp : 7-16.
- Salomon F., Deblaere, R., Leemans, J., Hernalsteens, J.P, van Montagu M., and Schell, J.** (1984). "Genetic identification of functions of TR-DNA transcripts in octopine crown galls." EMBO J. **3** : 141-146.
- Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis, T.** (1989). "Molecular cloning : A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **74** : 5463-5467.
- Sawada, H., Ieki, H., Oyaisu H., and Matsumoto, S.** (1993). "Proposal of rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*." Int. J. Syst. Bacteriol. **43** : 694-702.
- Sawada, H., Takikawa, Y., and Ieki, H.** (1992). "Fatty acid methyl ester profiles of the genus *Agrobacterium*." Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **58** : 46-51.

- Schardl, C. L., and Kado, C. I.** (1983). "A functional map of nopaline catabolism genes on the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* C58." *Mol. Gen. Genet.* **191** : 10-16.
- Schell, J., van Montagu, M., De Beuckeleer, M., De Block, M., Depicker, A., De Wilde, M., Engler, G., Genetello, C., Hernalsteens, J.P., Holsters, M., Seurnick, J., Silva, B., van Vilet, F., and Villaroel, R.** (1979). "Interaction and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the Ti-plasmid and the plant host." *Proc. Royal Soc. London Ser. B* **204** : 251-266.
- Schmülling, T., Fladung, M., Grossmann, K., and Schell, J.** (1993). "Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA." *Plant J.* **3** : 371-382.
- Schmülling, T., Schell, J., and Spena, A.** (1988). "Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development." *EMBO J.* **7** : 2621-2629.
- Schmülling, T., Schell, J., and Spena, A.** (1989). "Promoters of the *rolA*, *B*, and *C* genes of *Agrobacterium rhizogenes* are differentially regulated in transgenic plants." *Plant Cell* **1** : 665-670.
- Schröder, G., Waffenschmidt, S., Weiler, E.W., and Schröder, J.** (1984). "The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid." *Eur. J. Biochem.* **138** : 387-391.
- Serino, G., Clérot, D., Brevet, J., Costantino, P., and Cardarelli, M.** (1994). "*rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* cucumopine strain: sequence, effects and pattern of expression." *Plant Mol. Biol.* **26** : 415-422.
- Shen, W.H., Davioud, E., David, C., Barbier-Brygoo, H., Tempé, J., and Guern, J.** (1990). "High sensitivity to auxin is a common feature of hairy root." *Plant Physiol.* **94** : 554-560.
- Shen, W.H., Petit, A., Guern, J., and Tempé, J.** (1988). "Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** : 3417-3421.
- Shimoda, N., Toyoda-Yamamoto, A., Aoki, S. and Machida, Y.** (1990b). "Genetic evidence for an interaction between the VirA sensor protein and the ChvE sugar binding protein of *Agrobacterium tumefaciens*." *J. Biol. Chem.* **268** : 26552-26558.
- Shimoda, N., Toyoda-Yamamoto, A., Nagamine, J., Usami, S., Katayama, M., Sakagami, Y., and Machida, Y.** (1990-a). "Control of expression of *Agrobacterium tumefaciens* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 6684-6688.
- Shirasu, K., and Kado, C.I.** (1993). "Membrane location of the Ti plasmid VirB proteins involved in the biosynthesis of a pilin-like conjugative structure on *Agrobacterium tumefaciens*." *FEMS Microbiol. Letters* **111** : 287-294.
- Shirasu, K., Koukolikova-Nicola, Z., Hohn, B., and Kado, C.I.** (1994). "An inner-membrane-associated virulence protein essential for T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants exhibits ATPase activity and similarities to conjugative transfer genes." *Mol. Microbiol.* **11** : 581-588.

- Shirasu, K., Morel, P., and Kado, C.I.** (1990). "Characterization of the *virB* operon of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid: nucleotide sequence and protein analysis." *Mol. Microbiol.* **4**: 1153-1163 .
- Shurvinton, C.E., Hodges, L., and Ream, W.** (1992). "A nuclear localization signal and the C-terminal omega sequence in the *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 endonuclease are important for tumor formation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 11837-11841.
- Sinkar, V.P., Pythoud, F., White, F.F., Nester, E.W., and Gordon, M.P.** (1988). "*rolA* locus of the Ri plasmid directs developmental abnormalities in transgenic tobacco plants." *Genes Devel.* **2** : 688-697.
- Slightom, J.L., Durand-Tardif, M., Jouanin, L., and Tepfer, D.** (1986). "Nucleotide Sequence Analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* Agropine Type Plasmid." *J. Biol. Chem.* **261** : 108-121.
- Smith, E.F.** (1907). "The ethiology of plant tumors." *Science* **30** : 223-224.
- Smith, E.F., and Townsend, C.O.** (1907). "A plant tumor of bacterial origin". *Science* **25**: 671-673.
- Sonti, R.V., Chiurazzi, M., Wong, D., Davies, C.S., Harlow, G.R., Mount, D.W. and Signer, E.R.**(1995). "*Arabidopsis* mutants deficient in T-DNA integration." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** : 11786-11790.
- Spanò, L., Mariotti, D., Cardarelli, M., Branca, C. and Costantino, P.** (1988). "Morphogenesis and auxin sensitivity of transgenic tobacco with different complements of Ri T-DNA." *Plant Physiol.* **87** : 479-483.
- Spanò, L., Pomponi, M., Costantino, P., Van Slogteren, G.M.S., and Tempé, J.** (1982). "Identification of T-DNA in the root-inducing plasmid of agropine type *Agrobacterium rhizogenes* 1855." *Plant Mol. Biol.* **1** : 291-300.
- Spena, A., Aalen, R.B., and Schulze, S.C.** (1989). "Cell-autonomous behavior of the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* during leaf development: A visual assay for transposon excision in transgenic plants." *Plant Cell* **1** : 1157-1164.
- Spena, A., Schmillig, T., Koncz, C., and Schell, J.S.** (1987). "Independent and synergistic activity of *rol A*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants." *EMBO J.* **6** : 3891-3899.
- Sprunck, S., Jacobsen, H.J., and Reinard, T.** (1995). "Indole-3-lactic acid is a weak auxin analogue but not an antiauxin." *J. Plant Growth Regul.* **14** : 191-197.
- Spurr, A.R.** (1969). "A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy." *J. Ultrastruct. Res.* **26** : 31-34.
- Stahl, L., Jacobs, A., and Binns A.N.** (1998). "Conjugal intermediates of RSF1010 are required for inhibition of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens*." *J. Bacteriol.* **180** : 3933-3939.
- Stephens, K.M., Roush, C., and Nester, E.W.** (1995). "*Agrobacterium tumefaciens* VirB11 protein requires a consensus nucleotide binding site for function in virulence." *J. Bacteriol.* **177** : 27-36.

- Sun, L.Y., Monneuse, M.O., Martin-Tanguy, J., and Tepfer D.** (1991). "Changes in flowering and the accumulation of polyamines and hydroxycinnamic acid-polyamine conjugates in tobacco plants transformed by the *rolA* locus from the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*." *Plant Sci.* **80** : 145-156.
- Sundberg, C., Meek, L., Carroll, K., Das, A. and Ream, W.** (1996). "VirE1 protein mediates export of the single-stranded DNA binding protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells." *J.Bacteriol.* **178** : 1207-1212.
- Suzuki, K., Tanaka, N., and Yamashita, I.** (2001). "Mikimopine synthase (*mis*) gene on pRi1724." *Gene* **263** : 49-58.
- Suzuki, M.** (1989). "SPXX, a frequent sequence motif in gene regulatory proteins." *J.Mol..Biol.* **207** : 61-84.
- Tanaka, N., Ikeda, T., and Oka, A.** (1994). "Nucleotide sequence of the *rol* region of the mikimopine-type root-inducing plasmid." *Biosci. Biotech. Biochem.* **58** : 548-551.
- Taylor, B.H., White, F.F., Nester, E.W., and Gordon, M.P.** (1985). "Transcription of *Agrobacterium rhizogenes* A4 T-DNA." *Mol. Gen. Genet.* **201** : 546-553.
- Tempé J., and Petit A.** (1983). "La Piste des Opines". In *Molecular Genetics of Bacteria-Plant Interaction*, ed. A. Plüher, pp. 14-32.
- Tempé, J., and Goldmann, A.** (1982). "Occurrence and biosynthesis of opines." In *Molecular biology of plant tumors*. G. Kahl and J.S. Schell, eds. pp. 427-449.
- Tempé, J., Petit, A., Holsters, M., van Montagu, M. and Schell, J.** (1977). "Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation : Possible relation to transformation in crown gall". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** : 2848-2849.
- Tepfer, D.** (1984). "Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype." *Cell* **37** : 959-967.
- Tepfer, D., and Tempé, J.** (1981). "Production d'agropine par des racines formées sous l'action d'*Agrobacterium rhizogenes* souche A4. » *Cr. Hebd. Séances Acad. Sci.* **Ser III** : 153-156.
- Thomashow, L.S., Reeves, S., and Thomashow, M.F.** (1984). "Crown gall oncogenesis: Evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indoleacetic acid." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 5071-5075.
- Thomashow, M.F., Karlinsey, J.E., Marks, J.R., and Hurlbert, R.E.** (1987). "Identification of a new virulence locus in *A. tumefaciens* that affects polysaccharide composition and plant-cell attachment." *J. Bacteriol.* **169** :3209-3216.
- Thomashow, M.F., Karlinsey, J.E., Marks, J.R., and Hurlbert, R.E.** (1987). "Identification of a new virulence locus in *A. tumefaciens* that affects polysaccharide composition and plant-cell attachment." *J. Bacteriol.* **169** :3209-3216.

- Thompson, D.V., Melchers, L.S., Idler, K.B., Schilperoort, R.A., and Hooykaas, P.J.J.** (1988). "Analysis of the complete nucleotide sequence of the *Agrobacterium tumefaciens* virB operon." Nucl. Acids Res. **16** : 4621-4636.
- Tinland, B.** (1996). "The integration of T-DNA into plant genomes." Trends Plant Sci. **1** : 178-184.
- Tinland, B., Rohfritsch, O., Michler, P., and Otten, L.** (1990). "*Agrobacterium tumefaciens* T-DNA gene *6b* stimulates *rol*-induced root formation, permits growth at high auxin concentrations and increases root size." Mol. Gen. Genet. **223** : 1-10.
- Tinland, B., Schoumacher, F., Gloeckler, V., Bravo, A.M., Angel, M., and Hohn, B.** (1995). "The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome." EMBO J. **14** : 3585-3595.
- Toro, N., Datta, A., Carmi, O.A., Young, C., Prusti, R.K., and Nester, E.W.** (1989). "The *Agrobacterium tumefaciens* virC1 gene products binds to overdrive, a T-DNA transfer enhancer." J. Bacteriol. **171** : 6845-6849.
- Trovato, M., Mauro, M.L., Costantino, P., and Altamura, M.M.** (1997). "The *rolD* gene from *Agrobacterium rhizogenes* is developmentally regulated in transgenic tobacco." Protoplasma **197** : 111-120.
- Ulmasov, T., Liu, Z.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J.** (1995). "Composite structure of auxin response elements." Plant Cell **7** : 1611-1623.
- Umber, M., Voil, L., Weber, A., Michier, P., and Otten, L.** (2002). "The RolB-like part of the *Agrobacterium rhizogenes* orf8 gene inhibits sucrose export in tobacco." Mol. Plant-Microbe Interact. **15** : 956-962.
- van Altvorst, A.C., Bino, R.J., van Dijk, A.J., Lamers, A.M.J., Lindhout, W.H., van der Mark, F., and Dons, J.J.M.** (1992). "Effects of the introduction of *Agrobacterium rhizogenes* *rol* genes on tomato plant and flower development." Plant Sci. **83** : 77-85.
- van Haaren M.J.J., Sedee, N.J.A., Schilperoort, R.A., and Hooykaas, P.J.J.** (1987). "Overdrive is a T-region transfer enhancer which stimulates T-strand production in *A. tumefaciens*." Nucl. Acids Res. **15** : 8983-8997.
- van Larebecke, N., Engler G., Holsters M., Van den Elsacker S., Zaenen I., Schilperoort R.A., and Schell J.** (1974). "Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability." Nature **252** : 169-170.
- van Onckelen, H.A., Prinsen, P., Inzé, D., Rudelsheim, P., Van Lijsebettens, M., Schell, J., van Montagu, M., and De Greef, J.** (1986). "*Agrobacterium* T-DNA gene 1 codes for tryptophan-2-monooxydase activity in tobacco crown gall cells." FEBS Lett. **198** : 357-360.
- Vauchret, H., Kronenberger, J. Rouzé, P., and Caboche, M.** (1989). "Complete nucleotide sequence of the two homeologous nitrate reductase genes." Plant Mol. Biol. **12** : 597-600.

- Veluthambi, K., Krishnan M., Gould J.H., Smith R.H., and Gelvin S.B.** (1989). "Opines stimulate induction of the *vir* genes of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid." *J.Bacteriol.* **171** : 3696-3703.
- Vergunst A.C., Schrammeijer B., den Dulk-Ras A., de Vlaam C.M.Regensburg-Tuink T.J., and Hooykaas P.J.J.** (2000). "VirB, D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells." *Science* **290** : 979-982.
- Vieira J., and Messing J.** (1982). "The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion, mutagenesis and sequencing with synthetic primers." *Gene* **19** : 259-68.
- Vilaine, F., Charbonnier, C., and Casse-Delbart, F.** (1987). "Further insight concerning the TL region of the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* strain A4: Transfer of a 1.9 kb fragment is sufficient to induce transformed roots on tobacco leaf fragments." *Mol. Gen. Genet.* **210** : 111-115.
- Wabiko, H., and Minemura, M.** (1996). "Exogenous Phytohormone-Independent Growth and Regeneration of Tobacco Plants Transgenic for the *6b* Gene of *Agrobacterium tumefaciens* AKE10." *Plant Physiol.* **112** : 939-951.
- Ward, J.E., Akiyoshi, D.E., Regier, D., Datta, A., Gordon, N.P., and Nester, E.W.** (1988). "Characterization of the *virB* operon from an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid." *J. Biol. Chem.* **263** : 5804-5814.
- Watson B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton M.D., and Nester, E.W.** (1975). "Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*." *J. Bacteriol.* **64** : 123-155.
- Whatley, M.H., and Spreess, L.D.** (1977). "Role of bacterial lipopolysaccharide in attachment of *Agrobacterium* to moss." *Plant Physiol.* **60** : 765-766.
- White, F.F., Taylor, B.H., Huffman, G.A., Gordon, M.P., and Nester, E.W.** (1985). "Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*." *J. Bacteriol.* **164** : 33-44.
- Willems, A., and Collins, M. D.** (1993). "Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences." *Int. Syst. Bacteriol.* **43** : 305-313.
- Willmitzer, L., Sanchez-Serrano, J., Buschfeld, E., and Schell, J.** (1982). "DNA from *Agrobacterium rhizogenes* is transferred to and expressed in axenic hairy root plant tissues." *Mol. Gen. Genet.* **186** : 16-22.
- Winans, S.C.** (1992). "Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions." *Microbiol. Rev.* **56** : 12-31.
- Winans, S.C., Mantis N.J., Chen C.Y., Chang C.H., and Han D.C.** (1994). "Host recognition by the VirA, VirG two-component regulatory proteins of *Agrobacterium tumefaciens*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 6522-6526.

**Wood D.W., and 49 others authors** (2001). "The genome of the Natural Genetic Engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58." *Science* **294** (5550) : 2317-2223.

**Yamada, T., Palm C.J., Brooks B., and Kosuge T.** (1985). "Nucleotide sequences of the *Pseudomonas savastanoi* indole acetic gene show homology with *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 6522-6526.

**Yokoyama, R., Hirose, T., Fujii, N., Aspuria, E.T., Kato, A., and Uchimiya, H.** (1994). "The *rolC* promoter of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants." *Mol. Gen. Genet.* **244** : 15-22.

**Young J. M., Kuykendall L. D., Martinez-Romero E., Kerr A., and Sawada H.** (2001). "A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as a new combinations : *Rhizobium radiobacter*, *R. Rhizogenes*, *R. Rubi*, *R.undicola* and *R. vitis*." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51** : 89-103.

**Zaenen, I., Van Larebeke, N., Teuchy H., Van Montagu M., and Schell J.** (1974). "Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains." *J. Mol. Biol.* **86** : 109-127.

**Zambryski, P.C.** (1992). "Chronicles from *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story." *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **43** : 465-490.

**Zambryski, P.C., Tempé J., and Schell J.** (1989). "Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants." *Cell* **56** : 193-201.

**Zhu,J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P. J. J., Farrand, S. K., and Winans, S. C.** (2000). "The bases of crown gall tumorigenesis." *J. Bacteriol.* **182** : 3885-3895.

**Zupan, J.R., and Zambryski, P.C.** (1995). "Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell." *Plant Physiol.* **107**: 1041-1047.

**Zupan, J.R., Citovsky, V., and Zambryski, P.C.** (1996). "*Agrobacterium* VirE2 protein mediates nuclear uptake of single-stranded DNA in plant cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2392-2397.

## Références informatiques

Pour la figure 8: <http://www.ejbiotechnology.info>

Pour la recherche des motifs: <http://www.motif.genome.ad.jp>

## ANNEXES

**Annexe 1** : Séquence nucléotidique de la jonction Pro8-GUS. Les sites *Sal*I, *Xho*II sont soulignés. Les codons ATG de l'ORF8 et du gène GUS sont indiqués en gras (voir chapitre II, § 2.1.2.3).

<u>GTCGAC</u> CCCC	AGGTTGTCAG	AAAATACGTT	CTCGGTCTTT	TCGACGCCCC	GACAATGGTT	60
GAGCCCCGCG	ATATCAGCAG	AGCGAGCTTC	TGCAGCCAAT	ATATAACTTT	CCGGGAACCA	120
CATCCCTGTA	AGGAGTTCAA	TGAAATTGGT	GTCTGATCCT	CGATGCTGCT	GCTAAAAATGC	180
TCGAAAGTTA	TGCCGAATTC	CTGGAAGACG	ATGGAAGCGA	TGATAATGAA	ATTGCGAGCG	240
TTAAAGATGT	ATTTGGCTTA	ATTGATAGGA	CATTATGAGC	ACGATACAAA	ACAGAAGCAG	300
TAACGGAAGT	TTCCAATGTG	TTTGATATTT	GTGTTGCCAT	TGTATGTTGA	ATTCCTTTTG	360
TCAATCTTAT	TGCATGTTTCG	AAATTGCATA	AATTTGGGCC	GTAATTTTCC	GACTTTTTTTG	420
AATTTTCGTT	CATCTCTTTA	ATTGTTGATG	TTGTCTAGGG	AGACAGCTTT	ATTGAATTTT	480
AATGACATGT	CGCCATTTAC	GTGTACATCA	GAATAAAAAG	ATAATTCCGG	CAAATAGTTT	540
CAATTTATAT	ATATTACATC	CAGATTTACA	TTAACAAAGC	ORF8 <b>ATG</b> CCTTCTA	TAAACAAAAG	600
GAAATTCTAT	ATTCTCTCAA	TACTCCATAT	CTACATGATG	<u>GATCCCCGGG</u>	TAGGTCAGTC	660
GUS CCTT <b>ATG</b> TTA	CGTCCTGTAG	AAACCCCAAC	CCGTGAAATC	AAAAAACTCG	ACGGCCTGTG	700

**Annexe 2** : Séquence nucléotidique du promoteur minimal 35S. Les sites *Hind*III et *Sph*I sont indiqués en gras (voir chapitre II, § 2.1.2.2).

```

      V      V      V      V      V      V      V
AAGCTTCGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAA 70
TTCGAAGCAGTTGTACCACCTCGTGTGTGTGAACAGATGAGGTTTTTATAGTTTCTATGTCAGAGTCTT

      V      V      V      V      V      V      V
GACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAG 140
CTGGTTTCCCGTTAACTCTGAAAAGTTGTTTCCCATTATAGGCCTTTGGAGGAGCCTAAGGTAACGGGTC

      V      V      V      V      V      V      V
CTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAA 210
GATAGACAGTGAAATAACACTTCTATCACCTTTTCTTCCACCGAGGATGTTTACGGTAGTAACGCTATT

      V      V      V      V      V      V      V
AGGAAAGGCCATGGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGC 280
TCCTTTCCGGTACCAACTTCTACGGAGACGGGTGTCACCAGGGTTTTCTACCAGGGGGTGGGTGCTCCTCG

      V      V      V      V      V      V      V
ATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACG 350
TAGCACCTTTTTCTTCTGCAAGGTTGGTGCAGAAGTTTCGTTACCTAACTACACTATAGAGGTGACTCC

      V      V      V      V      V      V      V
TAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTT 420
ATTCCCTACTGCGTGTTAGGGTGATAGGAAGCGTTCTGGGAAGGAGATATATTCTTCAAGTAAAGTAAA

      V
GGAGAGGACCAGCATGC      437
CCTCTCCTGGTCGTACG

```

**Annexe 3** : 1- Séquence nucléotidique de la partie codante de l'ORF8 (coordonnées : 4402 à 6744 ; Brevet, GenBank, accession AJ271050, 2000).

```

4381 CCAGATTTAC ATTAACAAAG CATGCTTTCT ATAAACAAAA GGAAATTCTA TATTCTCTCA
4441 ATACTCCATA TCTACATGAT GGATCTTCCC TATAACCGCC CCCGTTTCCC CCCGTTTGCT
4501 ATCACC GGTC TACCTAGTGC GGCCAAACTG AAACGAGCAA TTTCTCGGGC CTTTGTCTGC
4561 TATGACCAGT TTTGCGATGA ACTCCTACAA TATCAGCAAA GGTGGACGGA TTGGGTGTTC
4621 GACCACGGAT TTGCAGAAGC CATAGAAGAC ATGGCTCTGG TGTTCCAGAT TGAACCTTGC
4681 CTTTCATGGTC CCCGAACAGG CACACTGGAA GTGCTGAGAT CTTGTGCGAC GAAGGTCTTC
4741 ATTTATACGT CGTACCGCAG GTTGCGCCAC TTTGTTGAGA ACCAGTGCAT TGCTCAACCT
4801 GGCGACGCCG TCCTTGCTTG CATGATCCCG CCCTACGTGA GTGACCTCTC ACTGCAGGAA
4861 ATGTCTCGAG CCCACAATAG TTTTGTGCCA GGCAGTCACA CGAGCATTGC AGACGTGCAG
4921 TGCTTTATTG CCATCCAAC T CAGCAGCCTA TTTGTTGAGG AGGGTACATG TGATGTGCAT
4981 GGGCGAAATG GATTAATAAAC AACCTGCCGC TTCTTTTCGTC GTCCCCTGTA GTGCTTCAGC
5041 CGTTACGACA TAGTTGCAAT AGGGTCTGTG CTCTTTTACA ACGCATTGCA TCAGCCAGCG
5101 AACTACAATG AGGATCTTTC TTGCTTCGAT CTGCGGTACG ACTATCAGGT TTTCTCCAT
5161 GAGCGCGATG CCAATGATGG TGTGGGGCAT TATCCGGAAG GCACACCACT ACCTAGTGTG
5221 GCCATCGTAG GTGGTGGGCT CTCTGGCCTT GTTGCTGCTG CAGAATACTG TGACGCTGGC
5281 GTCAGGGAAA TAGCCCTTTT TACCCAGTA GATGAGGTTT GGAGTTTGGG TGTATCGCCG
5341 ATGTCAAACG GCGACGCTCG CCAGGTCTTG ACGTCATTCTG GTGTCATGCC CATCTCCGGC
5401 AACCAAGTTT GTCTGTGATA CTATCTGGAT AAGTTTAGAA TTCCGTCCAG CCTTCGTTTT
5461 CTTTGTGCCG GCAACGATCA CACAGCACTC TACTTCCGGA AAAAAAGTTA CGAATGGCCG
5521 GCTGGACAAG CTCCACCAGG TGAATTCCAG CGGATATCTG CAGGGTGGGA GAAACTACTA
5581 TACCACGGGT GTGAACGGAA CGGCAGGAGG CTGATCGCTC CGATGGATAT CTTTTCCATG
5641 CTGAGAGGTC GCGGTTATGA AGAAGCCTCG GAAGCAAGGC GGGCTTGGCT CAGGGAGTTT
5701 GATAATTTCA CTTTCCATGC CGCTCTGGTC GAGATCTTCA GCTGCGGTGT CGAGAGTCTT
5761 GGTGGGGCGG CATGGCAAAC AACTGATTTT GCTGCTTTTC GGATGATGAG ATTGGGCGGC
5821 GGCCGAGTTT CTTCTGTGTA CACCCTACTG TTTTCGACAG TCCTGGACTG GATAATCAAT
5881 GGGTACGAGG AGGACCAGTA TATCTCTGTT GGAGGGGTTT ATCTTTTGA GGCTCTGATG
5941 CGCATTGAGA TATTCAAGAG AAAAGTAGGA TTCCATTTTG ACCCCCTGCG TGGACTAGCC
6001 AAGGAGGGCG GGAAAGTGAA GGTATGCATG AAAGATGGCC GTTCGCGCGT TTTTGACCAG
6061 GTCATCATTG GCGGGCGAGG TGGGCCCAGT GCAACTAATA TCACTCCGGT TAGCCATGTG
6121 ACCTGTGTCG GCTATGATAT CGAAGCCCCC GCTGGAAACT CGTCTGCTAC TGTTAACGCA
6181 GCACTTTTCA TGATCACAAA GCAAAAATTC TGGCTTGATG ACGATATCCC AGCTTTGATC
6241 TGGACGGATG GGCTCGTCCG TGAGCTCTGT TGTATTGACA TCGAATCGCC ATCGGGAGAG
6301 GGGCTTGTTA TTTTTCATTA TGAAATGAAC GACTATCTAT CCCGCCGTT CCAGTCCGAT
6361 GAGAAGAAGA GAAGGTGCTT GGATTTAGTC AGAGAACTTG CTGCTGTCTT TCCTGAATTG
6421 GCTTGTGATT TGTTCCAGT CAACGAAGAT TACGAAGAAT ATGTCTTCGA CGGCCACTTG
6481 AAGGATGGTT TCAGGGCCTC TTTATGGAGG GAAAATTCTC TTAATAAATG TCAGTACAGC
6541 CAAGATCCGC ATATGTATGA TTCTCCGTTA ATGGAGCATG GGGCAGTTTG CCAGATTGAC
6601 AGTAAGGACT GCGTAAACGG AGCTTTGTTC GAAGAGCAGG TTAAGACGGG CATCATAACG
6661 GCCTGCACCG TCATTGCGAG CACCGGCGGG AACTATCTT CACTCCATCC CCTGGATTGG
6721 AATAAAATAT ATTTTCTGCT TTAAGTATAT TAATGTATTA GTGCGTATTA ATCCCGTAAG

```

**Annexe 3** : 2- Séquence protéique déduite de la séquence nucléotidique de l'ORF8 (Brevet ; GenBank, accession AJ271050, 2000).

"MPSINKRKFYILSILHIYMMDLPLYNRPRFPFAITGLPSAAKLR  
RAISRAFVCYDQFCDELLQYQQRWTDWVFDHGFAEAIEDMALVFQIEPCLHGPRTGTL  
EVLRSCTRKFVIYTSYRRLRHFFVENQCIAQPGDAVLACMIPPYVSDLSLQEMSRHNS  
FCPGSHTSIADVQCFAIQLSLFFVEEGTCDVHGRNGLKTTCRFFRRPAECFSRYDIV  
AIGSVLFHNALHQPANYNEDLSCFDLRYDYQVFLHERDANDGVGHYPEGTPLPSVAIV  
GGGLSGLVAAAELLDAGVREIALFTPVDEVRS LGVSPMSNGDARQVLTSFGVMPISGN  
QVCLSYLDKFRIPSSLRFP CAGNDHTALYFRKKRYEWPAGQAPPGEFQRISAGWEKL  
LYHGCERNRRLIAPMDIFSMLRGRRYEEASEARRAWLREFDNFTFHAALVEIFSCGV  
ESPGGAAWQTTDFAAFGMMRLGGGRVSSCYTLLFSTVLDWIINGYEEDQYISVGGVHL  
LQALMRIEIFKRKVG FHF DPLRGLAKEGGKVKVCMKDGRSRVFDQVIIGGRGGPDATN  
ITPVSHVTCVGYDIEAPAGNSSATVNAALFMITKQKFWLDDDIPALIWT DGLVRELCC  
IDIESPSGEGLVIFHYEMNDYLSRPFQ SDEKKRRCLDLVRELA AVFPELACHLV PVNE  
DYEEYVFDGHLKDGFRASLWRENSLKKCQYSQDPHMYDSPLMEHGAVCQIDSKDCVNG  
ALFEEQVKTIITACTVIRSTGGT LSSLHPLDWNKIYFPA "