

PARTIE VI

Approche moléculaire et amélioration des plantes

45

L'application du génie génétique en Bulgarie

ATANAS I. ATANASSOV

Institute of Genetic Engineering, 2232 Kostinbrod-2, Bulgarie.

L'agriculture est, parmi les industries bulgares, la plus ancienne et la plus efficace.

Afin de maintenir la qualité des cultures agricoles prioritaires, un système national pour le génie génétique a été créé en 1985. L'Institut de génie génétique a également été établi en 1985, il fonctionne comme un centre méthodologique et scientifique, et coordonne les activités de 27 laboratoires de culture de tissus végétaux dans le pays.

La Bulgarie étant un pays plutôt petit a développé ses biotechnologies végétales en suivant strictement les programmes de sélection classique. L'approbation des projets scientifiques se fait fondamentalement à partir des problèmes rencontrés par les sélectionneurs, et à la demande de l'économie nationale. Généralement, ces objectifs ne peuvent pas être obtenus par les méthodes classiques de sélection et sont des problèmes locaux (résistance à la sécheresse, maladies spécifiques, résistance aux herbicides, etc..).

Les méthodes développées avec le plus de succès sont :

- la micropropagation clonale et l'élimination des virus chez nombre de cultures ornementales, forestières, fruitières et autres genres comme la pomme de terre, la betterave à sucre, les fraises, etc. ;
- la production d'haploïdes et de dihaploïdes chez le blé, le tabac, le triticale, le riz, le maïs, les piments, les tomates, les petits pois, les choux, les cornichons, le tournesol ;
- la sélection cellulaire chez l'orge, le tournesol, la luzerne, le riz et le blé ;
- le clonage de gènes a aussi obtenu ses premiers succès avec le virus TSWV et PPV dont les génomes ont été entièrement séquencés ; les gènes clonés ont été exprimés dans le tabac ;

– les méthodes de transfert de gènes ont été développées avec succès chez le tabac et la luzerne ; les descendances des plantes transgéniques sont à l'étude.

Aujourd'hui, la biotechnologie bulgare souffre des tendances négatives de la période de transition vers l'économie de marché ; parmi celles-ci, les plus sévères sont la désintégration des centres de recherche et les problèmes financiers drastiques. Par ailleurs, les règlements juridiques comme la loi sur la propriété intellectuelle et la législation sur les organismes ingénierés ne sont pas encore en place. Tout cela limite le développement des recherches malgré les nouveaux enjeux de collaboration qui s'ouvrent pour les chercheurs et les industriels.

46

Physiologie de la tubérisation chez la pomme de terre cultivée (*Solanum tuberosum* L.) : quelques conclusions de données moléculaires

PATRICK du JARDIN

*Unité de Biologie végétale, Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, avenue
du Maréchal-Juin, Bât. 48, B-5030 Gembloux, Belgique.*

La tubérisation de la pomme de terre désigne la formation d'un organe de réserve et de propagation par expansion radiale de l'extrémité d'un stolon, tige souterraine à croissance plagiotrope. Cet événement anatomique dépend de l'interaction entre des facteurs génotypiques et environnementaux. A l'intérieur du genre *Solanum*, certains génotypes, comme *S. brevidens*, ne forment jamais de tubercules, d'autres, comme *S. demissum*, tubérisent en jour court uniquement ; enfin *S. tuberosum* tubérise dans de larges gammes de traitement photopériodique. Parmi les facteurs environnementaux, la photopériode, la qualité de la lumière, la température et la nutrition minérale (azotée en particulier) sont reconnues comme généralement déterminantes. Les hormones jouent un rôle complexe dans ce processus, assurant probablement à la fois la transmission des stimuli environnementaux aux différents niveaux de l'organisation de la plante et conditionnant la réceptivité des tissus et cellules à ces stimuli. L'existence d'une hormone « tubérigène » a été postulée sur base d'expériences de greffe indiquant qu'une feuille préalablement exposée à des jours courts et greffée sur une plante traitée en jours longs est capable d'induire la tubérisation de cette dernière. La nature du facteur transloqué a été activement recherchée. Aucune des phytohormones « classiques » ne

semble jouer ce rôle : cytokinines, auxines, éthylène, acides gibbérellique et abscissique ont des effets divers sur la formation du tubercule mais aucune de ces molécules ne fonctionne comme inducteur direct. Leur rôle peut dès lors être limité au conditionnement des organes à émettre, à transmettre et à interpréter les signaux primaires de tubérisation. Par ailleurs, l'acide jasmonique et certains dérivés comme le méthyl-jasmonate ont été récemment identifiés comme inducteurs de tubérisation lorsqu'ils sont appliqués à des segments nodaux de tige de pomme de terre. Cette famille moléculaire s'avère intervenir dans d'autres processus physiologiques comme le contrôle de la sénescence et les réponses systémiques à des agressions entomologiques, mais leurs modes d'action et de synthèse restent largement à étudier.

Afin de mieux comprendre le contrôle de la tubérisation, on peut espérer un bénéfice substantiel d'une meilleure définition de la diversité des événements cellulaires et moléculaires sous-jacente à la formation du tubercule. Leur régulation peut être étudiée indépendamment, conduisant à l'identification de facteurs de contrôle généraux ou spécifiques. D'autre part, d'éventuelles relations d'interdépendance dans l'expression des diverses composantes de la tubérisation peuvent être précisées. Les observations présentées ci-après explicitent ce point de vue.

Tubérisation anatomique et tubérisation biochimique

La formation d'un tubercule n'est pas limitée à la région subapicale d'un stolon. Lorsqu'une plante de pomme de terre est cultivée en jours courts et qu'un segment de tige portant une feuille bien développée est prélevé et maintenu en survie dans une atmosphère humide, le bourgeon axillaire forme un tubercule sessile (Figure 1). Si le bourgeon est excisé avant le prélèvement de l'explant, aucune différenciation morphologique n'est observée, mais une coupe histologique transversale dans le pétiole révèle après coloration à l'iode que les parenchymes accumulent de grandes quantités d'amidon (Figure 2). De plus, l'analyse électrophorétique des protéines solubles de tels pétioles à différents moments après le prélèvement de l'explant indique que des protéines caractéristiques du tubercule en développement s'accumulent parallèlement à l'amidon (Figure 2). Ces observations indiquent que les composantes biochimiques de la tubérisation (l'accumulation d'amidon et de protéines de réserve) peuvent s'exprimer indépendamment de la croissance d'un organe de réserve. Inversement, peut-il y avoir différenciation anatomique en l'absence de la synthèse des macromolécules caractéristiques du tubercule, amidon et protéines de réserve ? La technologie des ARN antisens a permis de répondre à cette question par le blocage indépendant de l'expression des gènes de patatines [2] et de celle du gène codant pour une des deux sous-unités de l'ADPglucose pyrophosphorylase [3]. Si le premier travail indique que l'absence des protéines de réserve du groupe des patatines n'affecte pas le développement morphologique du tubercule, le blocage de la synthèse d'amidon conduit, lui, à la production de tubercules plus nombreux et plus petits, certains ayant un phénotype ridé (*shrunk*), comme les pois de Mendel, eux aussi déficients en amidon. Ces altérations sont probablement liées à l'accumulation de saccharose observée et à la perturbation du statut osmotique de l'organe.

En conclusion, la tubérisation dans son acception générale consiste en la juxtaposition d'une différenciation anatomique et d'une différenciation biochimique. Les événements biochimiques peuvent être observés indépendamment de la production d'un

organe de réserve. En revanche, la croissance normale d'un tubercule est tributaire de l'accumulation d'amidon, probablement parce que ce polymère permet le stockage des sucres importés sous une forme osmotiquement neutre. Le schéma de régulation présenté à la Figure 3 peut dès lors être proposé.

Accumulation de l'amidon et des protéines de réserve patatine

La différenciation biochimique peut être décomposée en deux événements principaux : l'accumulation d'amidon et celle des protéines de réserve, dont les patatines. Dans quelle mesure ces deux composantes sont-elles connectées, voire hiérarchisées sur le plan de leur régulation ? Par exemple, un précurseur de l'amidon fonctionne-t-il comme régulateur de l'expression des gènes de patatine ? Auquel cas il ne pourrait y avoir synthèse des patatines sans un parcours au moins partiel de la voie amylosynthétique.

Plusieurs éléments de réponse peuvent être apportés. Les travaux déjà cités [2, 3] indiquent en effet que la répression des gènes de patatine dans le tubercule n'affecte pas significativement la synthèse de l'amidon, mais que le blocage de la synthèse de ce polysaccharide réduit spectaculairement l'expression des patatines, et cela alors que la méthode mise en œuvre (utilisant des ARN antisens) est très ciblée sur l'inhibition d'une enzyme spécifique de l'amylosynthèse. Par ailleurs, notre groupe a démontré que les régions promotrices des gènes de patatine (des classes I et II) présentent de courtes régions nucléotidiques conservées avec des domaines répétés dans le promoteur du gène de la petite sous-unité de l'ADPglucose pyrophosphorylase. Puisque les ARNm correspondants sont coexprimés dans plusieurs contextes de développement, notamment lors de l'induction de la tubérisation biochimique dans des pétioles (Figure 4), il est probable que des facteurs protéiques nucléaires communs régulent les deux types de promoteurs par liaison aux motifs conservés. Cette hypothèse demande à être vérifiée.

A ce stade, la relation entre l'accumulation d'amidon et celle des patatines peut donc être résumée par la Figure 5, proposant d'une part l'existence de facteurs régulateurs communs et d'autre part celle d'un contrôle de l'expression des patatines par l'amylosynthèse.

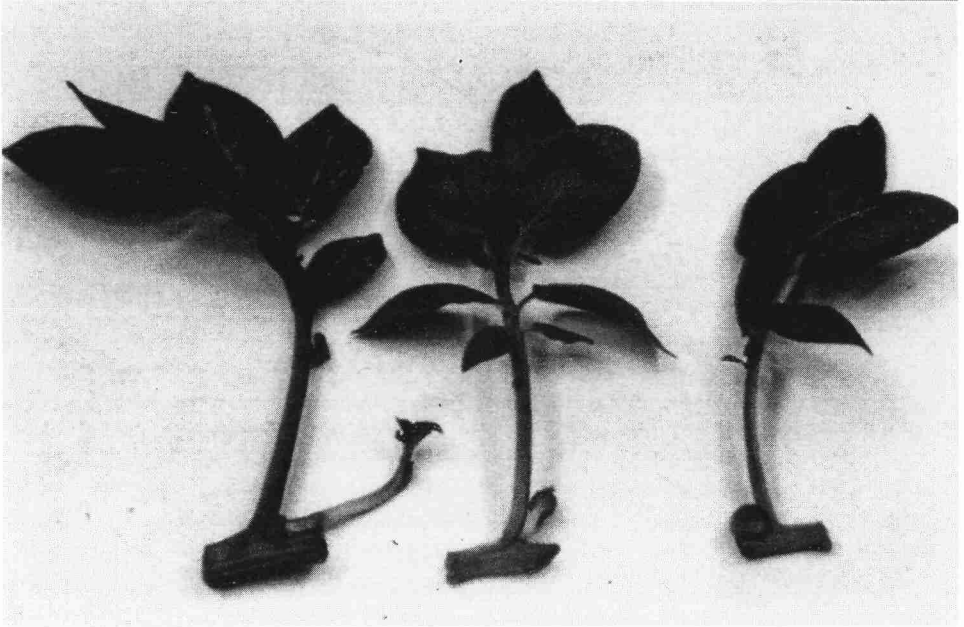


Figure 1. Formation d'un tubercule axillaire chez un explant folié de pomme de terre (cv. Désirée). L'explant de droite provient d'une plante traitée en jours courts (8 h de lumière par 24 h) et développe un tubercule sessile au départ du bourgeon axillaire lorsque, après le conditionnement photopériodique, l'explant est prélevé et maintenu en survie dans une enceinte saturée en eau. Lorsque les plantes donneuses sont cultivées sous des jours plus longs, les explants développent des tubercules à l'extrémité de courts stolons (explant du milieu) ou des pousses feuillées (explant de gauche). Cette expérience indique que la tubérisation anatomique n'est pas limitée aux stolons souterrains.

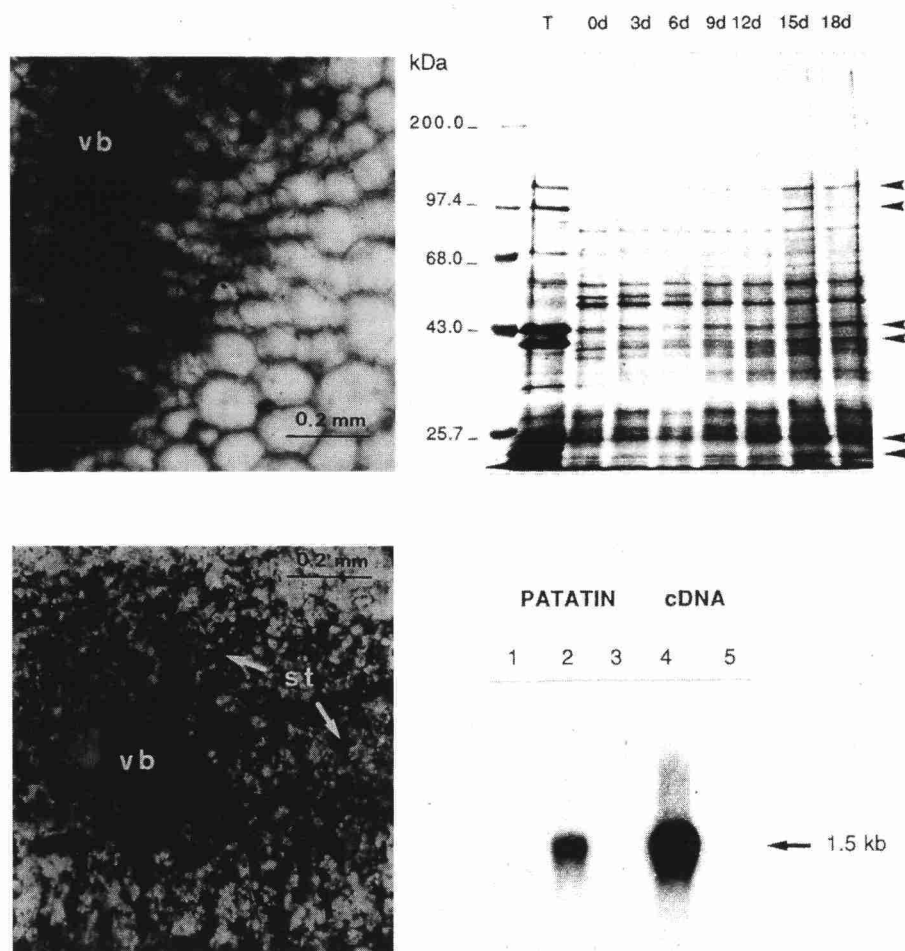


Figure 2. Tubérisation biochimique au niveau de pétioles d'explants foliés de pomme de terre dont les bourgeons axillaires ont été excisés ; les explants ont été prélevés sur des plantes cultivées en jours courts. *Au-dessus à gauche*, coupe transversale dans un pétiole témoin provenant d'une plante cultivée en serre. *En bas à gauche*, coupe transversale dans un pétiole accumulant de l'amidon suite au conditionnement photopériodique de l'explant et à l'excision du bourgeon axillaire (vb : tissus vasculaires ; st : amidon). *Au-dessus à droite*, évolution du profil des protéines totales des pétioles au cours de l'accumulation d'amidon ; des protéines spécifiques du profil tubercule (« T ») s'accumulent dans les pétioles après 3, 6, 9, etc. jours (« 3d, 6d, 9d, etc. ») ; le jour 0 est celui du prélèvement de l'explant) et sont indiquées par des têtes de flèches. *En bas à droite*, l'expression des gènes de patatine est induite dans les pétioles accumulant de l'amidon (expérience de *Northern blot*, canal 2) comparativement aux pétioles témoins (canal 1) ; les canaux 3, 4 et 5 contiennent respectivement des ARN extraits de feuilles, de tubercules en développement au champ et de tubercules stockés au froid.

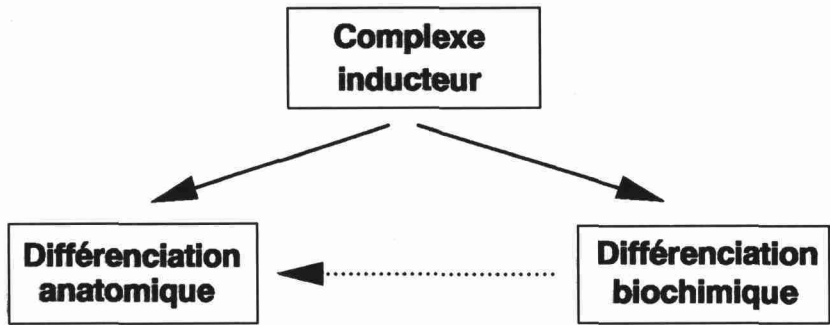


Figure 3. Modèle de régulation opérant au cours de la tubérisation de la pomme de terre. La tubérisation anatomique et la tubérisation biochimique peuvent avoir lieu indépendamment l'une de l'autre, mais une composante au moins de la tubérisation biochimique (l'accumulation d'amidon) influence le cours de la tubérisation anatomique. Le complexe inducteur est peu défini et peut comprendre des facteurs communs et spécifiques aux deux types de tubérisation.

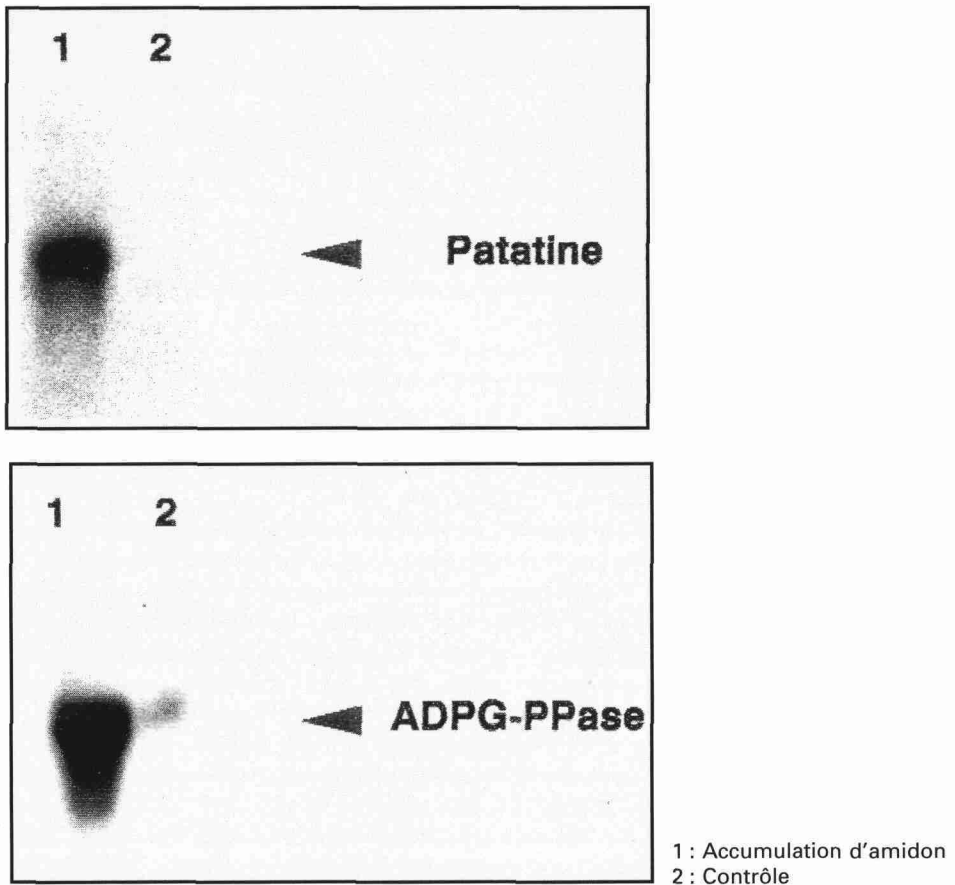


Figure 4. Accumulation coordonnée des ARNm codant pour les patatines et pour la petite sous-unité de l'ADPglucose pyrophosphorylase lors de l'induction de la tubérisation biochimique dans des pétioles d'explants foliés (se référer à la Figure 2 pour les détails du système expérimental). 10 µg d'ARN total ont été chargés par canal et transférés sur membrane de nylon, après dénaturation au glyoxal/diméthylsulfoxyde et fractionnement en gel d'agarose. L'hybridation des *Northern blots* a été réalisée au moyen de sondes d'ADNc spécifiques des patatines [4] et de la petite sous-unité de l'ADPglucose pyrophosphorylase (« ADPG-PPase » [1]).

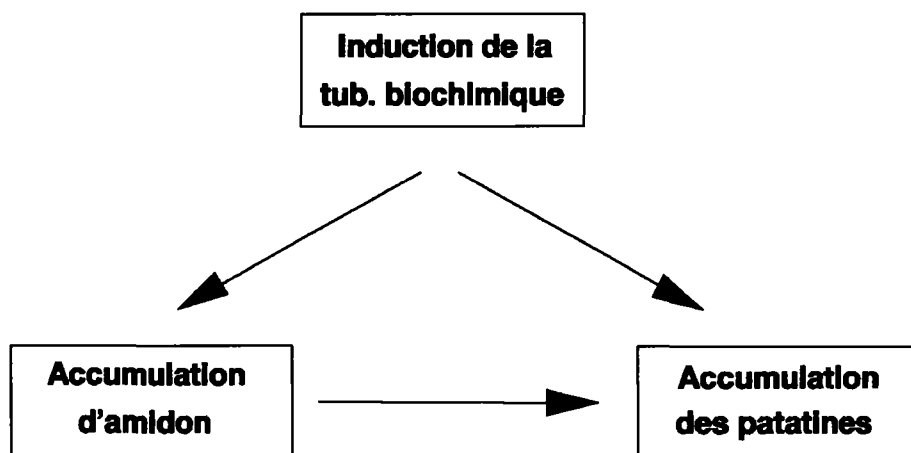


Figure 5. Modèle de régulation opérant lors de la synthèse des protéines de réserve patatine et de l'amylosynthèse dans le tubercule de pomme de terre. L'existence de facteurs communs de régulation est proposée, ainsi que celle d'un contrôle de la synthèse des protéines de réserve par l'amylosynthèse.

Conclusion

Chez le tubercule de pomme de terre en formation, différenciation anatomique et différenciation biochimique représentent deux groupes d'événements partiellement interdépendants. En effet, l'accumulation de macromolécules caractéristiques du tubercule peut être induite dans un contexte n'impliquant aucune production d'organe de réserve spécialisé, mais la formation d'un tubercule phénotypiquement normal est tributaire d'une synthèse active d'amidon. Par ailleurs, un jeu complexe – et largement ignoré dans sa nature – d'interrelations entre l'accumulation des protéines et celle de l'amidon opère dans le contexte de la tubérisation. Il ressort de ces observations que toute modulation du métabolisme de l'organe, même ciblée telle que le visent les approches de transgénèse, requiert une évaluation soigneuse de ces effets pléiotropiques. L'étude de tels effets conduira à mettre à jour des aspects essentiels de l'intégration des multiples composantes d'un processus développemental complexe comme la formation d'un organe de réserve et de propagation.

Remerciements : Les recherches originales de notre laboratoire sont financées au niveau belge par le Fonds de la Recherche Fondamentale Collective (Convention n° 2.4535.91).

Références

1. du Jardin P, Berhin A (1991). Isolation and sequence analysis of a potato cDNA clone encoding a subunit of the ADPglucose pyrophosphorylase of potato tuber amyloplasts. *Plant Mol Biol* 16 : 349-351.
2. Höfgen R, Willmitzer L (1992). Transgenic potato plants depleted for the major tuber protein patatin via expression of antisense RNA. *Plant Sci* 87 : 45-54.
3. Müller-Röber B, Sonnewald U, Willmitzer L (1992). Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J* 11 : 1229-1238.
4. Rosahl S, Eckes P, Schell J, Willmitzer L (1986). Organ-specific gene expression in potato : isolation and characterization of tuber-specific cDNA sequences. *Mol Gen Genet* 202 : 368-373.

47

Recherche de l'origine d'un cytoplasme CMS de *Nicotiana*, attribué à *N. glutinosa*

H. ROUSSEL, O. CHATAGNIER, H. DULIEU

Université de Bourgogne et INRA, Dijon, France.

Chez le tabac, il existe plusieurs sources de stérilité mâle (CMS) obtenues après des expériences de croisements interspécifiques avec des espèces de *Nicotiana* sauvages. Les sources les plus connues sont issues de croisements avec *N. bigelovii*, *N. debneyi*, *N. suaveolens* d'une part, et *N. glutinosa* et *N. plumbaginifolia*, d'autre part. Dans la première série, l'espèce sauvage est donneuse du cytoplasme, car elle fut le partenaire maternel dans le premier croisement et l'espèce cultivée fut utilisée comme parent paternel au cours de tous les croisements récurrents d'introduction du génome nucléaire *tabacum* dans la forme mâle-stérile. Dans les deux autres cas, le parent maternel fut l'espèce *N. tabacum* lors du premier croisement interspécifique et *N. tabacum* fut aussi le parent paternel au cours des croisements d'introgession [2].

Les études moléculaires sur l'ADN chloroplastique de ces différentes sources furent réalisées avec les enzymes de restriction par Frankel [7], Kung [9], en supposant que le partenaire maternel était toujours l'espèce sauvage ; cela résulte d'une mauvaise lecture de la publication de Burk [2]. Il n'est pas étonnant alors que Frankel [7] fût amené à classer les six sources analysées en deux groupes, selon qu'elles montraient le même profil électrophorétique après hydrolyse spécifique que celui de l'espèce sauvage, ou que le profil était différent de celui des deux espèces parentales, les différences portant sur deux ou trois fragments.

Ainsi, les ADNcp *debneyi*, *suaveolens* et *megalosiphon* furent groupés comme étant identiques à celui de l'espèce sauvage dont ils portent le nom, alors que les ADNcp

glutinosa, *bigelovii*, analysés par Frankel [7], et *plumbaginifolia*, analysé par Kung *et al.* [9], possédaient des fragments différents de ceux de chaque parent présumé.

Les interprétations données par Frankel *et al.* [7] étaient qu'il y avait eu correction de certaines séquences du génome chloroplastique sous l'influence du génome de l'espèce cultivée. Kung *et al.* [9], en revanche, firent l'hypothèse que l'ADNcp de la source *plumbaginifolia* se présentait comme une molécule recombinée à la suite d'une transmission biparentale de plastides, même si celle-ci avait eu lieu sous forme de traces.

Nous avons été intrigués par le fait que le cytoplasme de *glutinosa*, effectivement présent dans la souche *N. tabacum* var Samsun NN [3], n'entraîne aucune stérilité pollinique ; cela nous a conduits à étudier le prétendu cytoplasme *glutinosa*. Cette source fut obtenue par Burk en 1960, sous la forme d'un seul individu F1 d'une population hybride entre *N. tabacum* maternel $\times$ *N. glutinosa* paternel. Les nombreux rétro-croisements avec *N. tabacum* comme parent mâle n'ont pas fait disparaître la stérilité, liée à une morphologie florale typique : la corolle est plus courte que le style et l'androcée est totalement pétaloïde.

Les autres sources de stérilité ont aussi des morphologies florales typiques : corolle normale mais androcée pétaloïde pour *suaveolens* ; corolle très fortement laciniée et androcée stigmatoïde pour *bigelovii* ; corolle laciniée et androcée pétaloïde pour *debneyi*.

La question est donc de savoir si les différences entre l'ADNcp de *gluCMS* et ses parents putatifs sont le résultat d'un ou plusieurs remaniements à partir des molécules parentales, présentes au moins dans une cellule zygote de la population hybride F1 ou bien si l'origine ne peut être que fortuite à partir d'une graine extérieure contaminante. Il s'agit donc de pouvoir choisir entre une variation par recombinaison et une variation par divergence évolutive antérieure à l'apparition de la source *gluCMS*. La confrontation de données RFLP obtenues sur le génome entier du plaste à celles obtenues à l'échelle d'un gène, *rbcL*, gène codant la grande sous-unité de la Ribulose biphosphate carboxylase oxygénase (RUBISCO) devrait permettre d'orienter ce choix.

Grâce à la connaissance de la séquence complète de l'ADNcp de tabac [14], il est possible d'interroger n'importe quelle région du plastome des espèces voisines du tabac en l'amplifiant *in vitro*, par la réaction en chaîne par une polymérase (PCR).

Matériel et méthodes

Les sources CMS *glutinosa*, *debneyi*, *suaveolens* et *bigelovii*, appelées *gluCMS*, *debCMS*, *suavCMS* et *bigCMS*, nous ont été confiées par le Dr Frankel (Volcani Center, Israël). Elles ont été hybridées avec la variété *N. tabacum* Xanthi NC pour éviter les infections avec le virus de la Mosaïque. Les espèces sauvages *N. debneyi* et *glutinosa* proviennent des collections de l'Institut expérimental du Tabac à Bergerac (France).

L'isolement des chloroplastes pour l'amplification génique est réalisé par broyage de 5 g de feuilles ayant achevé leur croissance dans 20 ml d'un tampon à force ionique élevée, selon Bookjans *et al.* [1] : 50mM MES NaOH (pH 6,1), 25mM EDTA, 1,25M NaCl, 0,1 % albumine de bœuf, 10mM β mercaptoéthanol. Les filtrats de broyage sont centrifugés pendant 5 mn à 1 500 g ; le culot obtenu est remis en suspension dans le même tampon et centrifugé à vitesse un peu plus élevée, correspondant à 3 000 g. Le dernier culot est considéré comme une fraction chloroplastique purifiée.

L'isolement des chloroplastes pour l'analyse de restriction est réalisée de la même manière que pour l'amplification, sur une quantité de 10 à 20 g par échantillon.

L'isolement de la fraction mitochondriale se fait à partir du premier surnageant obtenu à 1 500 g. Ce surnageant est centrifugé à 3 000 g pour éliminer le contaminant chloroplastique et ensuite à 10 000 g pour sédimenter la fraction mitochondriale.

L'extraction de l'ADN chloroplastique se fait à partir du culot décollé à l'eau et dilué dans 2 ml d'un milieu lytique contenant Tris 0,2 M, EDTA 0,1 M, SDS 2 %, β -mercaptoéthanol 0,2 %, pH 8. Il est incubé pendant 10 mn à 60 °C et placé à 0 °C pendant quelques minutes. On ajoute alors 0,4 volume d'acétate de potassium 5 M, soit 0,8 ml, et on laisse précipiter au froid. Une centrifugation à 8 000 g pendant 15 mn permet de récupérer un surnageant clair dans un nouveau tube. Cette solution est déprotéinisée par un mélange chloroforme-phénol. On ajoute 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M à la phase aqueuse. L'ADN est alors précipité par 2,5 volumes d'éthanol froid. L'ADN séché est remis en solution à partir du précipité centrifugé à 8 000 g pendant 30 mn, dans un volume de 100 μ l de tampon Tris-HCl 10 mM/EDTA 1 mM. Il peut être traité par la RNase, déprotéinisé et à nouveau précipité.

L'ADN mitochondrial est préparé selon un protocole voisin de celui proposé par Perez *et al.* [10], en mettant le culot obtenu à 10 000 g en suspension avec un tampon contenant 1,25 M NaCl, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 10 mM KH_2PO_4 , à pH 7,2, avec 0,1 % de caséine. On ajoute MgCl_2 à 10 mM. La DNase I est ajoutée à 50 μ g/ml. Une incubation à froid a lieu pendant 30 mn. La réaction est arrêtée par l'ajout de trois volumes du même tampon pour un, contenant 50 mM d'EDTA. La sédimentation de la fraction mitochondriale débarrassée de l'ADN nucléaire est à nouveau réalisée à 10 000 g. Une deuxième dispersion de ce culot suivie de sédimentation est réalisée. L'ADN est alors extrait comme dans le cas des chloroplastes.

L'analyse des ADN par les enzymes de restriction est réalisée en hydrolysant 1 μ g d'ADN avec les endonucléases EcoRI, BamHI, PstI, XhoI et SmaI, dans les conditions conseillées par les fabricants (Boehringer M. Fr.). Les fragments sont séparés par électrophorèse en gels horizontaux à 1 % d'agarose. Les masses moléculaires apparentes sont évaluées par la comigration avec une échelle standard (BRL, 1 kbp).

Les amorces utilisées pour l'amplification sont préparées à partir de la séquence complète de l'ADNcp de *Nicotiana tabacum* et correspondent aux nucléotides 57 587 à 57 607 pour le côté 5'-3' et 59 000 à 59 020 complémentaires pour le côté 3'-5'. La longueur attendue de l'amplifiat est donc de 1433 pb, soit la longueur du gène *rbcL*.

Soient
5'-AAA-GTT-TGC-TTA-ACT-CTT-T-(G)-3'
5'-AAA-GAC-TTT-CTC-AAG-ATT-C-(T)-3'

La réaction de polymérisation est préparée avec le tampon de la polymérase Taq fourni par Appligène ; 2,5 mM des dNTP, 6 pM de chaque amorce, et 1 unité de polymérase Taq (Appligène). L'ADN modèle est celui des extraits de chloroplastes, 1 à 2 ng à la concentration de 1 à 2 ng/ μ l. Une première dénaturation a lieu pendant 3 mn à 95 °C. Les cinq premiers cycles de polymérisation comportent un palier à 93 °C pendant 1 mn, à 51 °C pendant 1 mn et, avec une pente de 1 °C par 2 s, 72 °C pendant 1 mn 30 s. Vingt cycles semblables sans pente programmée terminent l'incubation.

Le produit obtenu est hydrolysé séparément avec des endonucléases de restriction dont le site spécifique porte sur 4 bases de façon à augmenter la probabilité de coupure : AvaI, Sau3A, HaeIII, HinfI ; à 6 bases : BamHI et SmaI. Les produits d'hydrolyse sont séparés par électrophorèse dans de l'agarose à 2,2 % à côté d'un standard de poids moléculaire (« Ladder » 1 kbp de BRL).

L'observation de plusieurs différences entre l'ADNcp du *gluCMS* et les parents putatifs a conduit à estimer la proportion p_0 de nucléotides substitués entre chaque

paire de génotypes, permettant d'évaluer le degré de divergence [8]. On a aussi utilisé la méthode d'estimation de la distance d de Nei avec l'équation proposée par Li et Nei (1979) pour les nombres de fragments de restriction, notamment pour l'ADN mitochondrial, qui constitue une molécule nettement plus grande que l'ADN chloroplastique et dont les sites de restriction ne sont pas cartographiés.

Les groupements sont ensuite faits par la méthode UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*) (cf Swofford and Olsen, chapter 11, *Phylogeny Reconstruction* dans *Molecular systematics*, ed. Hillis et Moritz, 1990, Sinauer Ass., Inc., Sunderland, Mass., USA).

Résultats

Une première série d'analyses réalisées sur l'ADNcp total avec des enzymes de restriction reconnaissant 6 bases a préalablement montré que *gluCMS* différait de *tabacum* et de *glutinosa* par plusieurs fragments EcoRI [7].

Nous avons étendu cette analyse à d'autres enzymes.

Ainsi, BglII produit deux fragments, de 11,5 kbp et de 3,8 kbp, chez *tabacum* et chez *glutinosa* (Figure 1, puits 9, 10 et 12) ; ce fragment étant absent chez *gluCMS* (*id.* puits 11), qui possède un fragment exclusif de l'ordre de 20 kbp. Deux fragments, respectivement de 25 kbp et de 8 kbp, présents chez *glutinosa* et *gluCMS* (Figure 1, puits 10, 11 et 12) sont absents chez *tabacum* (puits 9). Un fragment de 39 kbp, présent chez *tabacum*, est absent chez les deux autres génotypes.

PstI produit un fragment de 25 kbp chez *tabacum* et *glutinosa* (Figure 1, puits 5, 6 et 8), absent chez *gluCMS* (Figure 1, puits 7).

XhoI produit un fragment de 14 kbp, chez *glutinosa* (Figure 1, puits 15 et 17), absent chez *tabacum* et chez *gluCMS* (Figure 1, puits 14 et 16). De plus, un fragment de 11 kbp est présent chez *N. tabacum* et *gluCMS* (Figure 1, puits 14 et 16), et absent chez *N. glutinosa* (Figure 1, puits 15 et 17).

Les puits 4, 8, 12 et 17 montrent les fragments obtenus avec *N. tabacum* var Sam-sun NN ; ils sont identiques à ceux obtenus avec *N. glutinosa*, ce qui confirme l'origine *glutinosa* des plastes chez cette variété [3].

Il est donc des cas où *gluCMS* est identique à l'un ou à l'autre des parents présumés, et d'autres où il diverge de ces derniers.

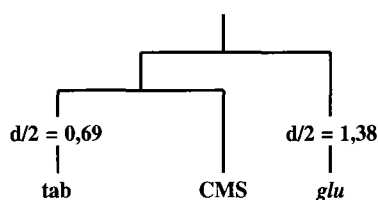
Le relevé des fragments communs c_i et différents d_i générés par six enzymes de restriction à six paires de bases (Tableau I) montre que *gluCMS* est plus proche de *glutinosa* que de *tabacum* malgré l'origine *tabacum* de ce cytoplasme indiquée par Burk [2].

Un relevé semblable, fait sur les fragments EcoRI et BamHI de l'ADN mitochondrial, manifeste une tendance à la divergence assez accentuée du *gluCMS* vis-à-vis de ses deux parents présumés (Tableau II). La Figure 2 montre la différence existant entre *gluCMS* et l'espèce *N. glutinosa* après hydrolyse avec BamHI et EcoRI.

L'explication de ces faits proposée initialement [5] était que des plastes et les mitochondries du parent paternel *glutinosa* auraient pu être transmis à un zygote exceptionnel lors du premier croisement, événement suivi d'une recombinaison interorganites (concernant plastes et mitochondries) et intermoléculaire. Cependant, la probabilité d'une telle série d'événements est d'une part très faible, et d'autant moins probable que la divergence génétique du CMS est très élevée alors qu'on s'attend à ce qu'elle soit à mi-distance entre les parents présumés, s'il s'agit d'ADN remaniés, même en plusieurs points.

Tableau I. Évaluation de la divergence entre l'ADNcp de *gluCMS* et ceux de *Nicotiana tabacum* (parent maternel présumé) et *N. glutinosa* (parent paternel présumé).

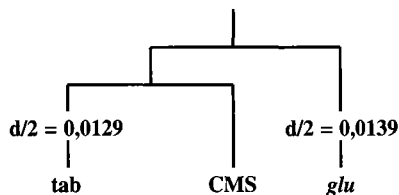
	<i>tab/glu</i>		<i>tab/CMS</i>		<i>glu/CMS</i>	
	ci	di	ci	di	ci	di
BglII	6	5	4	7	7	3
PstI	11	0	10	1	10	1
XhoI	13	5	15	5	13	5
SmaI	9	5	9	5	10	2
BamHI	15	6	15	6	18	0
Eco RI	17	4	18	3	18	3
Totaux	71	25	71	27	76	14
S =	0,85		0,84		0,92	
Po (%)	2,67		2,86		1,38	



Méthode Gotoh *et al.* [8] basée sur sites de restriction.

Tableau II. Évaluation de la divergence entre l'ADNmt de *gluCMS* et ceux de *Nicotiana tabacum* (parent maternel présumé) et *N. glutinosa* (parent paternel présumé).
Nombre totaux de fragments générés par EcoRI et BamHI, sur la diagonale ; nombre de fragments communs dans les autres cases.

	<i>N. tabacum</i>	<i>N. glutinosa</i>	<i>gluCMS</i>
<i>N. tabacum</i>	80	49	47
<i>N. glutinosa</i>	—	82	47
<i>gluCMS</i>	—	—	67

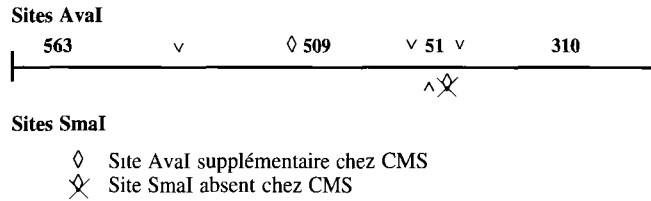


Les estimations de *d* sont faites selon l'équation proposée par Li et Nei (1979) pour les nombres de fragments de restriction.

Tableau III. Relevé des fragments communs ou différents observés après hydrolyse spécifique du produit d'amplification *rbcL*.

	<i>tab/glu</i>		<i>glu/CMS</i>		<i>tab/CMS</i>	
	ci	di	ci	di	ci	di
TaqI	7	—	7	1	6	1
HpaII	6	1	6	—	6	1
Sau3A	3	2	4	—	3	2
MaeI	1	—	1	—	1	—
HaeIII	2	2	3	—	2	2
AvaI	4	—	2	5	2	5
HinfI	3	—	5	—	4	2

Cartographie des sites variables entre CMS et *tab* ou *glu*



L'analyse à l'échelle du gène *rbcL*, région limitée à 1343 pb, devrait permettre d'éliminer ou de soutenir l'hypothèse de la nature éloignée ou xénique de l'ADNcp du *gluCMS*.

Le produit d'amplification obtenu est d'un poids moléculaire identique pour tous les plastotypes étudiés (Figure 3). La Figure 4 montre, en revanche, que la situation observée à l'échelle de l'ADN complet se reproduit pour une région limitée. En effet, l'hydrolyse avec AvaI et BamHI représente les cas où *gluCMS* est différent des deux parents présumés ; l'hydrolyse avec Sau3A, HaeIII et HinfI, les cas où *gluCMS* est identique à l'un des parents présumés, ici *glutinosa*.

Le relevé des fragments communs et différents (Tableau III) situe *gluCMS* plus près de *glutinosa* que de *tabacum*. L'information est cependant insuffisante pour considérer ce rapprochement comme significatif. Il est cependant certain que *gluCMS* diffère de ses deux parents présumés à l'échelle du gène *rbcL*.

Ainsi, l'analyse réalisée avec AvaI et SmaI permet de raisonner qualitativement et d'aboutir à la même conclusion. En effet, la séquence de l'ADNcp de tabac possède sur le fragment de 1433 pb 3 sites AvaI localisés sur les nucléotides n° 563, 1 072 et 1 123. La taille attendue des fragments est donc, dans l'ordre décroissant, de 563, 509, 310 et 51. On observe 4 fragments significatifs d'une longueur proche de 563, 509, 360 et 310. Le fragment de 360 indique une hydrolyse faible ou nulle du site n° 3.

N. glutinosa présente les mêmes fragments que le tabac. En revanche, le *gluCMS* montre des fragments de 563, 361, 265 et 244, correspondant à l'existence d'un nouveau site AvaI, confirmé par la disparition complète du fragment de 509.

L'hydrolyse avec SmaI, dont le tabac possède 2 sites, aux mêmes sites 1 072 et 1 123 que AvaI, devrait engendrer des fragments de 1 072, 310 et 51. On observe 1 072 et 310.

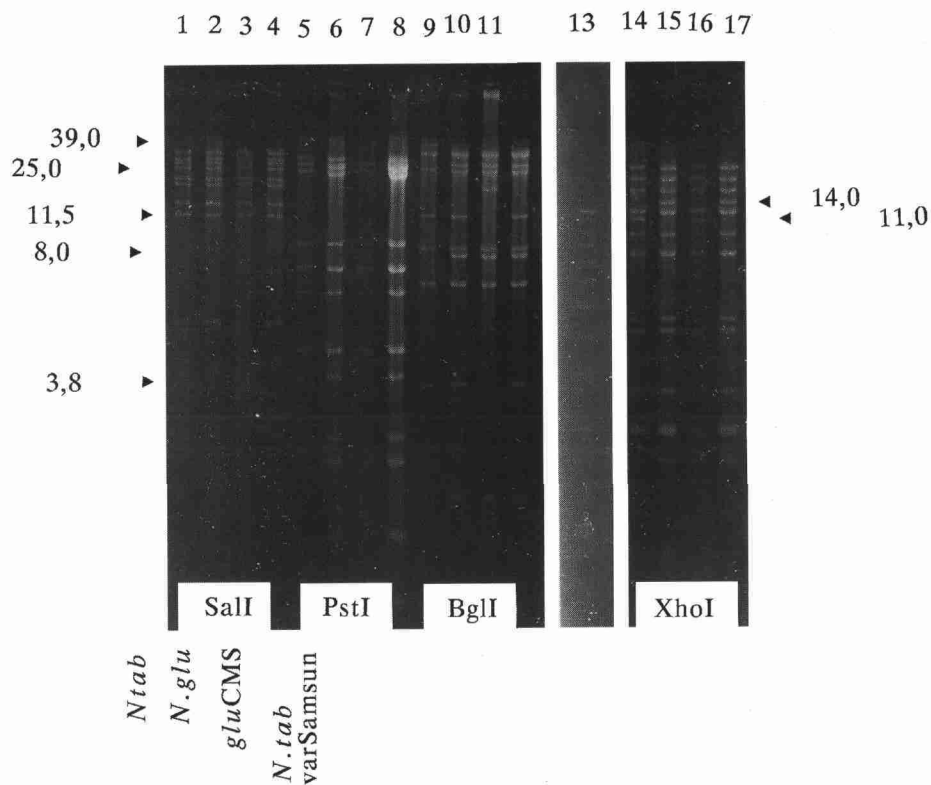
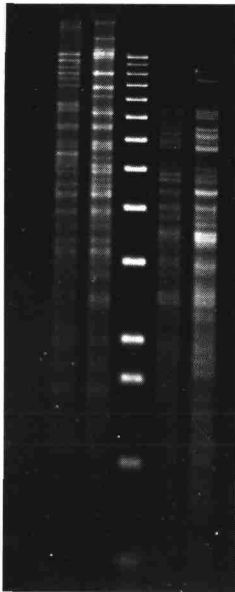


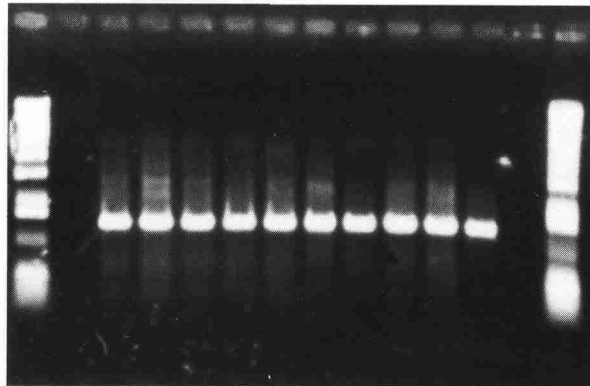
Figure 1. Électrophorèse sur gel d'agarose de 25 cm à 0,8 % des ADN chloroplastiques de *Nicotiana tabacum*, *N.glutinosa*, *gluCMS* et *N.tabacum* var. Samsun, cette dernière construite avec *N.glutinosa* comme parent maternel. Les puits 1 à 4, hydrolyse avec SalI, 5 à 8 avec PstI, 9 à 12 avec BglI ; l'échelle 1 kbp ; 13 à 16, hydrolyse avec XhoI.



BamHI EcoRI

gluCMS
N.glu

Figure 2. ADN mitochondriaux de *gluCMS* et de *N.glutinosa*, côte à côte, hydrolysés, à gauche de l'échelle, par BamHI, et à droite, par EcoRI.



N.tab *gluCMS* *N.glu*

Figure 3. Électrophorèse de fragments amplifiés du gène *rbcL*, chez *N.tabacum*, puits 3 à 4 ; *gluCMS*, puits 5 à 8 ; *N.glutinosa*, puits 9 à 12. Les quantités d'ADN matrice varient de 1 ng à 16 ng.

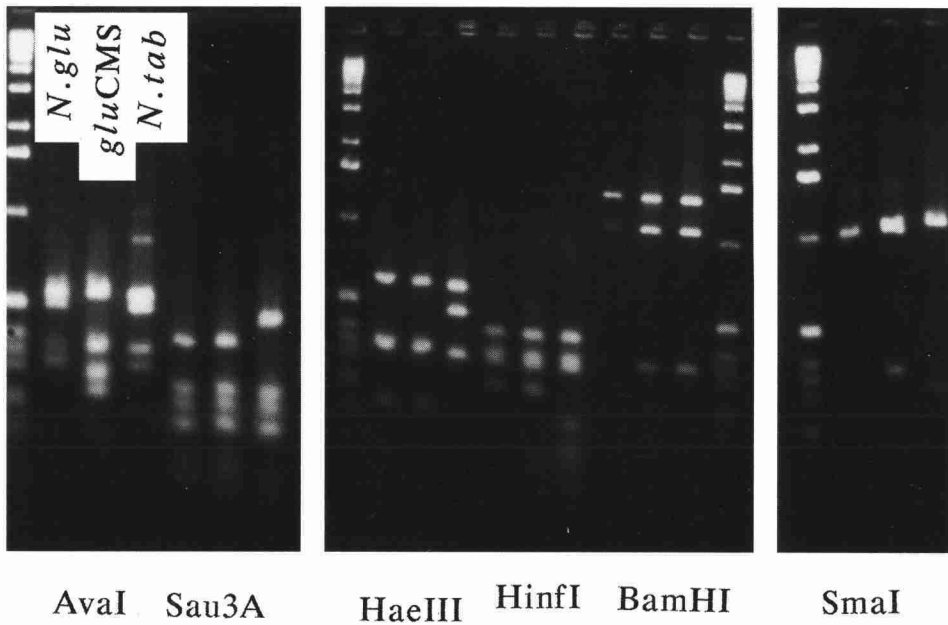


Figure 4. Électrophorèse des amplifiats du gène *rbcL* hydrolysés avec les enzymes de restriction. Puits n° 1, 8, 18 et 19 : échelle 1 kbp BRL. Les échantillons sont dans l'ordre *N.glutinosa*, *gluCMS*, et *N.tabacum*. Puits 2, 3 et 4 : *AvaI* ; puits 5, 6 et 7, *Sau3A* ; puits 9, 10, 11, *HaeIII* ; puits 12, 13 et 14, *HinfI* ; puits 15, 16 et 17, *BamHI* ; puits 20, 21 et 22, *SmaI*.

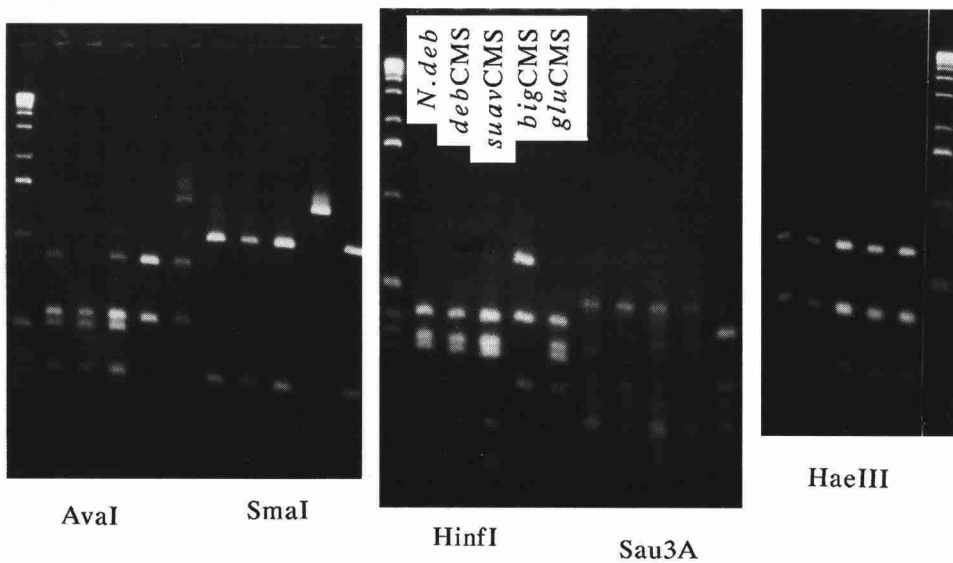


Figure 5. *Id.* Figure 2 avec les plastotypes *N. debneyi*, *debCMS*, *suavCMS*, *bigCMS*, *gluCMS*. Échelle 1 kbp aux positions 1 et 12. Puits 2 à 6, *AvaI* ; puits 7 à 11, *SmaI* ; puits 13 à 17, *HinfI* ; puits 19 à 22, *Sau3A* ; puits 23 à 27, *HaeIII*.

Chez *N. glutinosa*, on observe aussi 1 072 et 310. Le *gluCMS* montre des fragments de 1 072 et 360, comme les autres CMS sauf *big*. Cela correspond donc à la disparition du site *SmaI* 1 123 chez le *gluCMS*.

Voilà donc deux exemples : un site *AvaI* supplémentaire et un site *SmaI* en moins chez le *gluCMS* par rapport aux espèces présumées parentales qui montrent l'origine étrangère du CMS par rapport au deux parents cytoplasmiques présumés (Tableau III, cartographie).

Les autres CMS étudiés, *debneyi*, *suaveolens* et *bigelovii*, sont toutes différentes de *glu CMS* comme le montrent la Figure 5 ainsi que le Tableau 4.

Discussion – conclusion

La question posée était de savoir si le *gluCMS*, dont l'origine remonte à 1960, provenant selon Burk d'une plante parmi quelque 150 plantes hybrides normalement constituées, résulte bien d'un remaniement de ses ADN cytoplasmiques à partir de celui de ses deux parents présumés ou bien d'un cytoplasme étranger à celui de ces deux types *tabacum* et *glutinosa*.

La divergence importante déjà observée pour les sites de restriction à six bases sur les ADN chloroplastiques et mitochondriaux se trouve confirmée à l'échelle du kbp (kilo-paires de bases) par l'utilisation de l'amplification spécifique de la séquence du gène *rbcL*, obtenue grâce à la connaissance complète de la séquence de l'ADN plastidial de *N. tabacum*.

De plus, l'identification de cinq plastomes différents, dont quatre sont cotransmis avec la stérilité pollinique cytoplasmique, peut être faite rapidement par la même méthode d'amplification spécifique ou élective, suivie de l'hydrolyse avec des endonucléases de restriction à coupures fréquentes.

En conclusion, il est très probable que *gluCMS* provient d'un cytoplasme différent de tous ceux fournis par les espèces étudiées (*debneyi*, *suaveolens*, *bigelovii* et *glutinosa*, *tabacum*), et non pas d'une recombinaison qui aurait suivi une transmission paternelle de plastes et de mitochondries par *N. glutinosa*.

Un tel plasmotype pourrait résulter d'une contamination de la population de plantes hybrides par un individu présentant des anomalies florales, issu d'une autre espèce.

Références

1. Bookjans G, Stumman BM, Henningsen KW (1984). Preparation of chloroplast DNA from pea plastids isolated in a medium of high ionic strength. *Ann Biochem* 141 : 244-247.
2. Burk LG (1960). Male-sterile flower anomalies in interspecific tobacco hybrids. *J Hered* 51 : 27-31.
3. Clausen RE, Goodspeed TH (1925). Interspecific hybridization in *Nicotiana*. II. A tetraploid *glutinosa-tabacum* hybrid, an experimental verification of Winge's hypothesis. *Genetics* 10 : 278-284.
4. Davis RW, Thomas M, Cameron J, St. John TP, Scherer S, Padgett RA (1980). Rapid DNA isolations for enzymatic and hybridization analysis. *Methods Enzymol* 65 : 404-411.
5. Dulieu H, Chatagnier O (1988). Unsuspected nucleo-cytoplasmic combinations in Tobacco,

- communication n° 353, The second International Congress of Plant Molecular Biology, Jerusalem, nov. 13-18.
6. Fluhr R, Edelman M (1981). Physical mapping of *Nicotiana tabacum* chloroplast DNA. *Mol Gen Genet* 181 : 484-490.
 7. Frankel R, Scowcroft WR, Whitfield PR (1979). Chloroplast DNA variation in isonuclear male-sterile lines of *Nicotiana*. *Mol Gen Genet* 169 : 129-135.
 8. Gotoh O, Hayashi JI, Yonekawa H, Tagashira Y (1979). An improved method for estimating sequence divergence between related DNAs from changes in restriction endonuclease cleavage sites. *J Mol Evol* 14 : 301-310.
 9. Kung SD, Zhu YS, Chen K, Shen GF, Sisson VA (1981). *Nicotiana* chloroplast genome ; II. chloroplast DNA alteration. *Mol Gen Genet* 183 : 20-24.
 10. Perez C, Bonnavent JF, Berville A (1990). Preparation of mitochondrial DNAs from Sunflowers (*Helianthus annuus* L.) and from Beets (*Beta vulgaris*) using a medium with a high ionic strength. *Plant Mol Biol Report* 8 (2) : 104-113.
 11. Salts Y, Hermann RG, Peleg N, Lavi U, Izhar S, Beckmann JS (1984). Physical mapping of plastid DNA variation among eleven *Nicotiana* species. *Theor Appl Genet* 69 : 1-14.
 12. Scowcroft WR (1979). Nucleotide polymorphism in chloroplast DNA of *Nicotiana debneyi*. *Theor Appl Genet* 55 : 133-137.
 13. Seyer P, Kowallik KV, Herrmann RG (1981). A physical map of *Nicotiana tabacum* plastid DNA including the location of structural genes for ribosomal RNAs and the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase. *Curr Genet* 3, 189-204.
 14. Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng BY, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H, Sugiura M (1986). The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome ; its organization and expression. *EMBO J* 5 : 2043-2049.

48

Étude de la sensibilité d'*Acacia flava* et d'*Acacia nilotica* à *Agrobacterium tumefaciens*

LAURENT BRAY¹, VALÉRIE LECOUTURIER²,
MARIA NICOLA DI MICHELE¹

1. ISERST, Laboratoire de Lutte contre la Désertification, BP 486, Djibouti, République de Djibouti.

2. INSA, CNRS/URA 1486, Bât. 406, 20, avenue Albert-Einstein, 69621 Villeurbanne Cedex, France.

Résumé

La sensibilité d'A. flava syn. erhrenbergiana et d'A. nilotica à Agrobacterium tumefaciens a été testée afin d'évaluer les possibilités ultérieures de transformations génétiques.

Les inoculations sont effectuées par coculture en milieu liquide de boutures de vitro-plants, avec une souche binaire comportant le gène uid A codant pour la β -glucuronidase, et un gène de résistance à la kanamycine. Il a d'abord été prouvé qu'il n'y avait aucune activité GUS endogène chez A. flava et chez A. nilotica, et que le gène uid A pouvait donc être considéré comme marqueur de transformation. Chez A. flava, des précipités de diX-indigo ont été observés dans le cytoplasme des cellules de cals formés sur les boutures inoculées, et mises en culture sur le milieu de sélection. En revanche, aucune activité GUS n'a pu être mise en évidence après l'inoculation chez A. nilotica. Ces résultats sont discutés, étant donné que le gène uid A s'exprime aussi chez les bactéries. Cependant, l'étude cytologique chez A. flava montre que les cristaux de diX-indigo ont une localisation uniquement cytoplasmique, et sont absents des

noyaux et des espaces intercellulaires. Chez A. nilotica, d'autres tests sur des tissus plus juvéniles devront être conduits. L'introduction de gènes améliorant la résistance à la salinité chez A. flava peut déjà être envisagée, afin de résoudre les besoins spécifiques de Djibouti en manière de lutte contre la désertification.

Plusieurs stratégies existent pour améliorer les performances d'une espèce, la plus ancienne est la sélection sur la variabilité naturelle. Plus récemment, les techniques de transformation génétique se sont développées. Par rapport à la sélection, elles ont l'avantage d'enrichir génétiquement une espèce par l'apport de gènes étrangers d'intérêt agronomique. Ainsi, depuis 1981, date à laquelle la première plante transgénique a été obtenue [35], des gènes codant pour des résistances aux maladies virales [11], aux herbicides [4, 5] ou aux insectes [24] ont été introduits chez des plantes.

Djibouti, classé zone à climat aride [31], est confronté à un processus de désertification [10]. Ce phénomène est dû à la surexploitation par l'homme des ressources naturelles et a pour conséquence, entre autres, une salinisation progressive des eaux et des sols [28]. Le reboisement des zones affectées par la désertification doit donc être réalisé avec des végétaux résistants à la salinité. Une des possibilités est l'utilisation d'espèces halophiles pour les zones les plus marginales [17]. Cependant, étant donné que la quasi-totalité des terres affectées est constituée des terres de parcours [7], il est intéressant d'améliorer la résistance à la salinité d'espèces locales fourragères utilisées traditionnellement par les populations nomades.

Les ligneux transgéniques ont actuellement été obtenus par l'introduction d'un seul ou d'un nombre très faible de gènes : protection vis-à-vis des herbicides, des insectes ou des maladies [21, 22]. Du fait que la tolérance au sel est considérée comme un facteur polygénique dont l'ensemble des gènes impliqués n'est pas encore identifié, peu de résultats concernant des plantes transgéniques résistantes au sel sont actuellement disponibles. Cependant, il est reconnu depuis quelques années que des composés appelés osmoprotecteurs permettent à la plante qui les accumule de résister à la salinité [6, 23]. Ainsi, des tabacs transformés possédant un gène codant pour la synthèse du mannitol sont plus résistants aux fortes concentrations de NaCl que les plantes normales [29, 30].

Ces différents résultats permettent d'envisager l'amélioration de la résistance au sel des espèces ligneuses de Djibouti grâce aux transformations génétiques. La méthode de transformation la plus courante [33, 34] utilise les propriétés d'une bactérie, du genre *Agrobacterium*, qui effectue une transformation génétique naturelle des cellules végétales qu'elle infecte [12, 13]. Après la mise au point de milieux de callogenèse, cette méthode a donc été testée sur des espèces ligneuses fourragères locales considérées comme prioritaires pour Djibouti, *A. flava* et *A. nilotica*. Leur sensibilité à une souche binaire d'*Agrobacterium* comportant le gène de la β -glucuronidase (GUS) a été testée. Après avoir montré que le gène GUS peut effectivement être considéré comme marqueur de la transformation chez ces 2 espèces, une étude cytoenzymologique est effectuée afin de révéler les territoires transformés.

Matériels et méthodes

Matériels

• Matériel végétal

A. flava (Forsk.) Schweinf. var. *seyal* (Del.), synonyme d'*A. erhrenbergiana* [20], peuple des dépressions à sols argileux ou limoneux ; il supporte des sols modérément salés. C'est un arbre à usages multiples : principalement fourrage, mais aussi bois de chauffe, charbon, bois d'œuvre, production de tanins, clôtures sèches et pharmacopée [2].

A Djibouti, les aires de peuplements naturels de l'*A. nilotica* sont des dépressions temporairement inondées [2, 14, 20]. Son usage principal est le fourrage mais il sert aussi à la production de tanins et pour la pharmacopée [3].

• Souche bactérienne

Une souche binaire d'*A. tumefaciens*, dérivée de la souche LBA 4 404, est utilisée pour les tests de virulence. Cette souche, fournie par le laboratoire de génétique moléculaire microbienne de l'INSA-Lyon, contient un plasmide Ti désarmé porteur de la région *vir*, et le plasmide binaire pBI121. L'ADN-T du plasmide pBI121 inclut le gène *nptII* codant pour la néomycine transférase et le gène *uid A* codant pour la β -glucuronidase (Figure 1).

Les cellules transformées sont donc sélectionnées par leur résistance à la kanamycine due à l'expression du gène de la néomycine transférase et peuvent être mises en évidence par la cyto-enzymologie grâce à l'activité GUS.

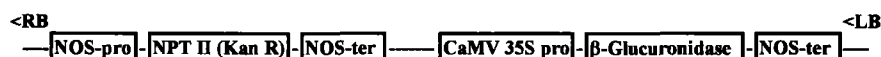


Figure 1. Schéma représentant la structure de l'ADN-T du plasmide pBI121. De la gauche vers la droite : NOS-Pro : site promoteur de la nopaline synthétase ; NPT II (Kan R) : gène codant pour la néomycine phosphotransférase et conférant la résistance à la kanamycine ; NOS-ter : site de polyadénylation de la nopaline synthétase ; CaMV 35S promoter : site promoteur de CaMV ; β -glucuronidase : gène *uid A* codant pour la β -glucuronidase ; NOS-ter : site de polyadénylation de la nopaline synthétase. Les différents sites de restriction ne sont pas représentés [19].

Méthodes

• Germination et obtention de plantules stériles

L'inhibition tégumentaire est levée par un traitement à l'acide sulfurique à 95 % (10 mn pour *A. flava* et 45 mn pour *A. nilotica*). Les semences sont ensuite nettoyées dans du papier filtre. La stérilisation est réalisée, sous hotte à flux laminaire, par de l'alcool à 70° pendant 10 mn, puis par une solution d'hypochlorite de sodium commerciale à 12° diluée à 50 % pendant 10 mn. Les semences sont finalement rincées 3 fois à l'eau distillée et stérilisée, et mises à germer par lots de 40 dans des pots de germination contenant de l'eau gélosée (agar-agar à 6 g.l⁻¹), stérilisés à 110 °C pendant 30 mn.

La photopériode dans la chambre de culture est de 16 heures, avec une énergie

lumineuse moyenne de 100 W.m² dispensée par 4 lampes OSRAM L30W/20 Coolwhite. La température est de 27 °C.

• **Milieu de callogenèse**

Les cotylédons et les boutures sont prélevés sur des plantules âgées de 20 jours. Tous les méristèmes sont excisés et les explants sont mis en culture horizontalement. Le milieu contient les éléments minéraux de Murashige et Skoog [25] et est additionné de 1 ml.l⁻¹ de la solution de vitamines de Nitsch et Nitsch [27] et de 50 g.l⁻¹ de saccharose. L'acide α -naphtylacétique est ajouté à raison de 1, 2 ou 3 mg.l⁻¹. Après 10 semaines de culture, la callogenèse est évaluée par le rapport entre la surface du cal formé et la surface de l'explant à l'état initial.

• **Entretien de la souche bactérienne**

La souche binaire LBA 4404 est cultivée à 26 °C, sur milieu de Luria-Bertani constitué de 5 g.l⁻¹ d'extrait de levure, de 10 g.l⁻¹ de chlorure de sodium et de 10 g.l⁻¹ de tryptone. Le pH est ajusté à 7,0 $\pm$ 0,1. Après la stérilisation à 110° pendant 30 mn, la kanamycine est ajoutée au milieu après la stérilisation à raison de 50 mg.l⁻¹.

• **Inoculation du matériel végétal par *A. tumefaciens***

Les inoculations sont effectuées par la co-culture en milieu liquide du matériel végétal avec les bactéries en phase exponentielle de croissance [16]. Les boutures prélevées sur des *vitro*-plants âgés de 6 semaines sont blessées par l'excision de leurs méristèmes et par des coupures superficielles au scalpel. Le matériel végétal est ensuite plongé pendant 5 mn dans une culture de bactéries d'un jour ($DO_{600} = 0,3$ correspondant à 5.10^8 cfu/ml). Après séchage sur papier filtre stérile, les boutures sont déposées pendant deux jours sur le milieu de callogenèse. Elles sont ensuite transférées sur le même milieu additionné de kanamycine à 100 mg.l⁻¹ pour sélectionner les tissus transformés et de céfotaxime à 250 mg.l⁻¹ pour éliminer les bactéries (Figure 2). Deux repiquages sur un milieu de sélection neuf sont effectués, l'un après 10 jours, l'autre après 6 semaines. Après 10 semaines, les échantillons sont prélevés et testés pour leur activité GUS.

• **Détection cytoenzymologique de l'activité β -glucuronidase**

La détection cytoenzymologique de l'activité de la β -glucuronidase est réalisée selon le protocole de Jefferson [20]. Le matériel végétal est incubé pendant 20 heures, à 37 °C au bain-marie, dans une solution de X-Glu (Sigma) à 1 mM, préparée dans du tampon phosphate pH 7 (Merck). Les coupes à main levée sont montées entre lame et lamelle dans du glycérol, et sont observées en microscopie photonique.

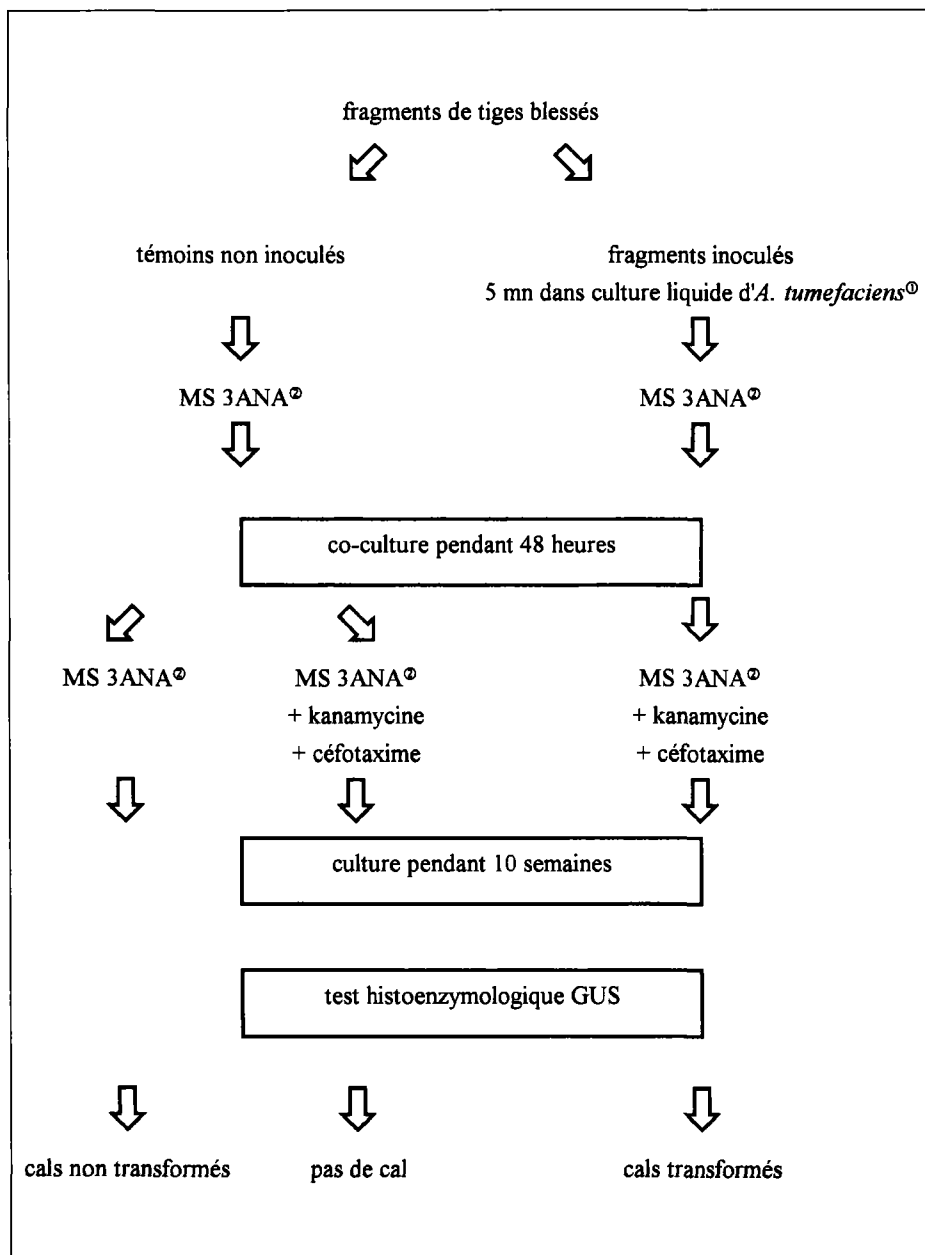


Figure 2. Schéma du protocole expérimental pour l'obtention de tissus transgéniques. ① inoculation avec la souche binaire LBA 4 404 contenant le plasmide pBI121. ② Milieu de base Murashige et Skoog (MS) additionné de 3 mg.l⁻¹ de ANA.

Résultats

Influence de l'origine de l'explant et de la concentration en ANA sur la callogenèse

Chez *A. flava* et *A. nilotica*, la callogenèse des boutures augmente en fonction de la concentration en ANA dans le milieu de culture (Figures 3a et b). A 3 mg.l⁻¹ d'ANA, la totalité des boutures mises en culture ont formé des cals et le rapport entre la surface du cal et la surface initiale de l'explant est significativement supérieur à celui calculé pour les témoins des 2 espèces testées.

En revanche, aucun des cotylédons d'*A. flava* ou d'*A. nilotica* déposés sur les différents milieux de culture ne développe de cal, et, au bout de 10 semaines, 85 % des cotylédons chez *A. flava* et 90 % chez *A. nilotica* sont nécrosés.

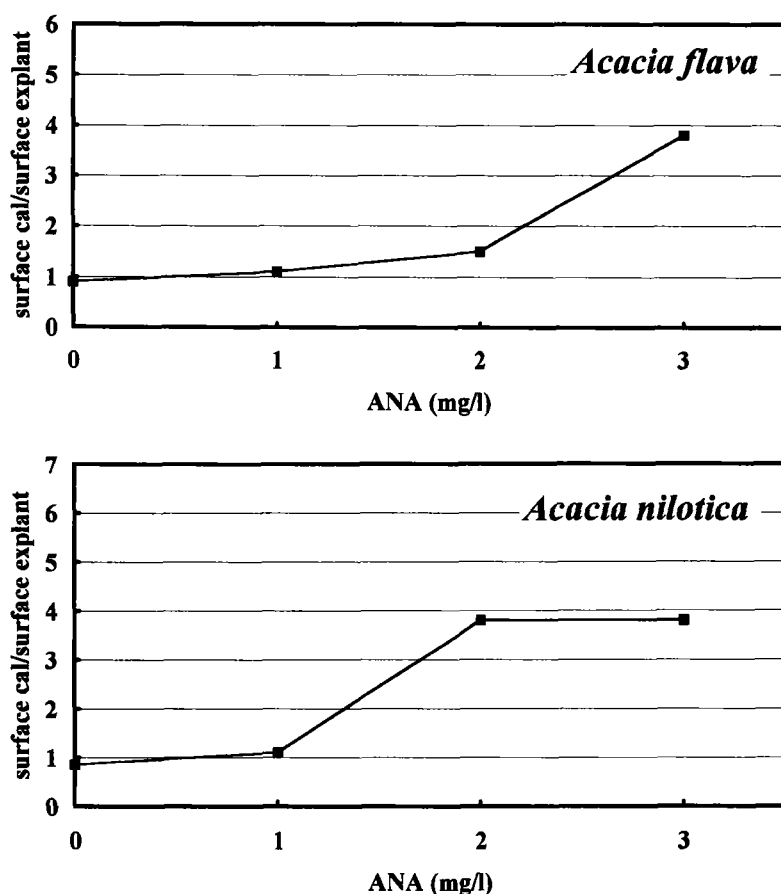


Figure 3. Influence de l'acide α -naphtylacétique sur la callogenèse d'*Acacia flava* syn. *erhbergiana* et d'*Acacia nilotica*. Le rapport entre la surface du cal et la surface initiale de l'explant est calculé 10 semaines après le repiquage sur le milieu de culture contenant les éléments minéraux de Murashige et Skoog et 50 g.l⁻¹ de saccharose.

Absence d'activité GUS endogène chez *A. flava* et *A. nilotica*

Aucune activité β -glucuronidase n'est mise en évidence chez les boutures d'*A. flava* non inoculées et cultivées pendant 10 semaines sur un milieu de callogenèse non sélectif, sans antibiotiques (Photo 1a). Chez *A. nilotica*, les résultats sont identiques (Photo 1b). Les 2 espèces testées sont donc naturellement dépourvues de toute activité GUS endogène.

Expression du gène GUS chez les bactéries

Des bactéries prélevées sur leur milieu de culture sont directement mises à incuber avec le X-Glu. Après 20 heures d'incubation, une coloration bleue apparaît, caractéristique du produit de la réaction GUS (Photo 2). Le gène GUS porté sur le plasmide binaire pBI121 s'exprime donc dans la bactérie.

Conséquences de l'inoculation par *A. tumefaciens*

• Callogenèse sur milieu de sélection

Pendant les 10 semaines de culture sur le milieu de callogenèse additionné d'antibiotiques (kanamycine et céfotaxime), aucune callogenèse n'est observée chez les boutures d'*A. flava* et *A. nilotica* non inoculées (Tableau I).

En revanche, dès 10 jours, chez *A. flava*, des cals apparaissent aux sites de blessure sur des explants inoculés. Chez *A. nilotica*, les cals n'apparaissent pas avant 30 jours. Après 10 semaines de culture, le pourcentage d'explants inoculés ayant développé un cal est de 3,6 % chez *A. nilotica* et de 10 % chez *A. flava* (Tableau I).

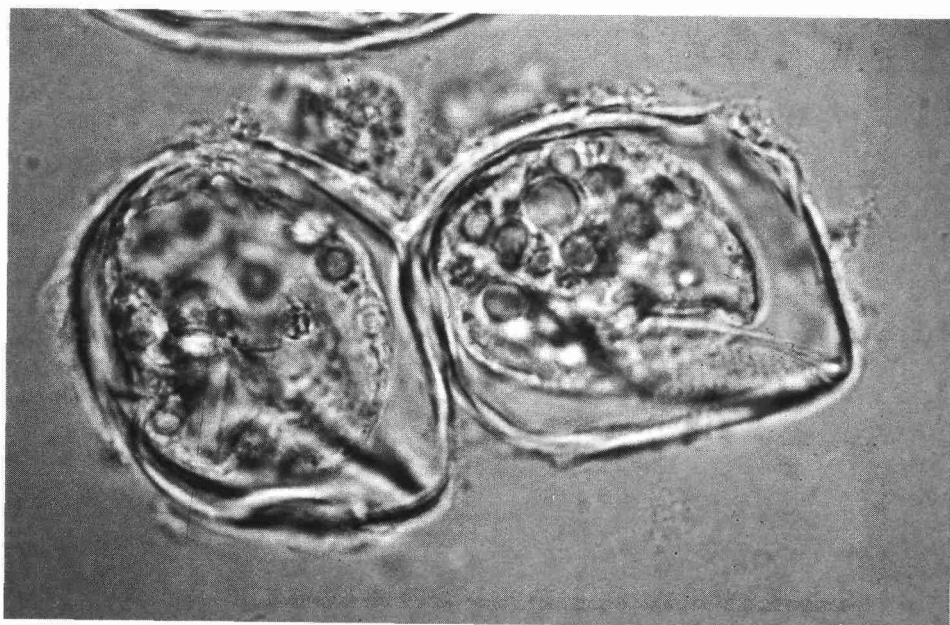
• Activité GUS

Les boutures non inoculées d'*A. flava*, cultivées sur le milieu de callogenèse additionné de kanamycine et de céfotaxime, ne montrent aucune activité GUS (Photo 3a). En revanche, une activité GUS est détectée dans les cellules de cals formés sur des boutures inoculées (Photo 3b). Les précipités de diX-indigo sont absents des espaces intercellulaires et des noyaux, et sont uniquement localisés dans le cytoplasme.

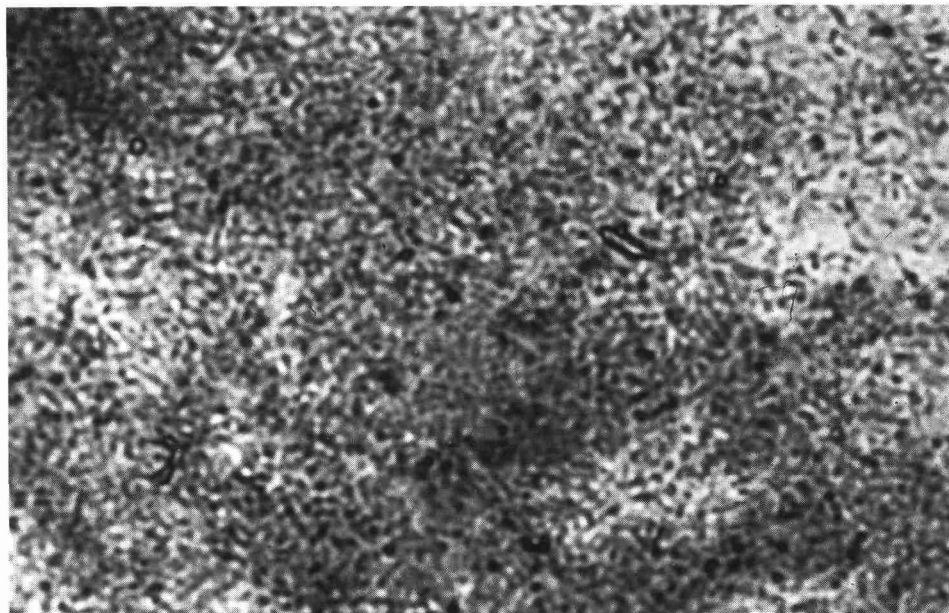
Chez *A. nilotica*, les tests GUS effectués sur les boutures témoins cultivées sur antibiotiques sont tous négatifs. De même, après 20 heures d'incubation, aucune coloration bleue n'est visible sur les différentes coupes réalisées dans les cals d'*A. nilotica* formés sur les sites de blessures des boutures inoculées.

Tableau I. Callogenèse obtenue chez *A. flava* et *A. nilotica* inoculés, après 10 semaines de culture sur milieu de base additionné de 3 mg.l⁻¹ d'ANA, de 100 mg.l⁻¹ de kanamycine et de 250 mg.l⁻¹ de céfotaxime.

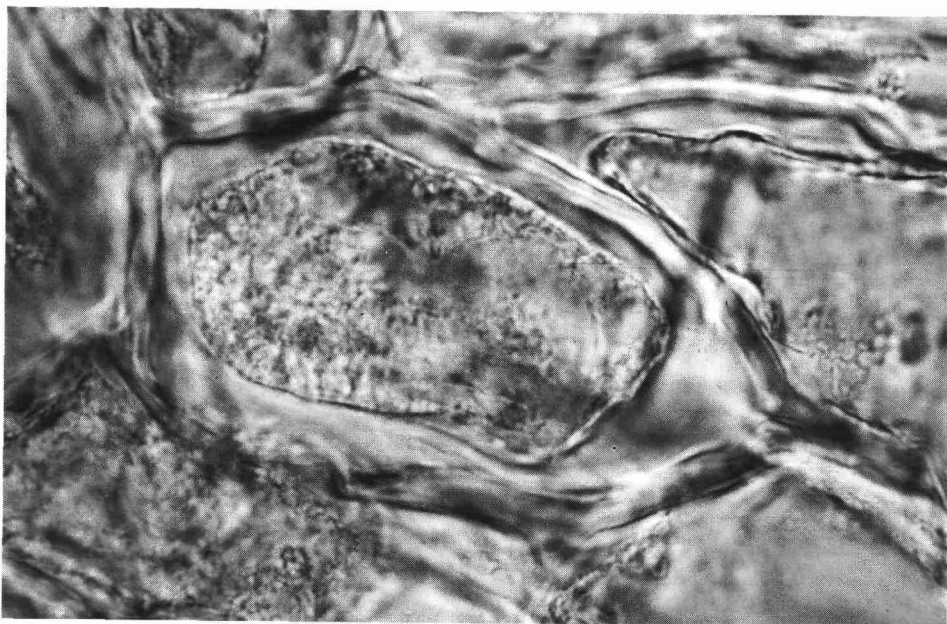
Espèce	Condition	Nombre total d'explants	Nombre d'explants ayant formé un cal	Pourcentage de callogenèse (%)
<i>A. flava</i>	inoculé	58	6	10
	témoin	9	0	0
<i>A. nilotica</i>	inoculé	56	2	3,6
	témoin	11	0	0



Photographies 1a et 1b. Absence d'activité GUS endogène dans les cellules de cals formés chez *A. flava* (1a) et chez *A. nilotica* (1b) cultivés 10 semaines sur milieu de callogenèse (a $\times$ 1 650 ; b $\times$ 1 650).



Photographie 2. Mise en évidence de l'expression du gène GUS dans la souche binaire d'*A. tumefaciens* (plasmide pBI121) (x 1 650).



Photographies 3a et 3b. *A. flava* incubé 20 heures avec X-Glu après 10 semaines de culture sur milieu de callogenèse additionné de kanamycine à 100 mg.l⁻¹ et de céfotaxime à 250 mg.l⁻¹. 3a : non inoculé ; 3b : inoculé avec la souche binaire d'*A. tumefaciens* contenant GUS (a $\times$ 1 650 ; b $\times$ 1 650).

Discussions et perspectives

Les inoculations par une souche d'*Agrobacterium tumefaciens*, contenant le gène GUS, ont permis l'obtention de cals sur milieu de sélection chez les deux espèces testées, *A. flava* et *A. nilotica*. Le gène GUS chez les 2 espèces peut être considéré comme marqueur de la transformation étant donné que, contrairement à quelques espèces végétales [26], le test GUS est négatif dans le matériel végétal normal non inoculé. D'autre part, une activité GUS a pu être mise en évidence dans les cals formés chez *A. flava* après l'inoculation par *A. tumefaciens*.

Cette activité GUS détectée après inoculation chez *A. flava* peut être discutée. En effet, nous avons montré que la souche bactérienne utilisée exprimait elle aussi le gène uid A. L'expression du gène GUS dans des souches d'*Agrobacterium* contenant des plasmides GUS dérivés du pBIN19 a déjà été rapportée [15,20]. Selon Jefferson [20], l'activité serait due à une transcription étendue jusqu'à la région GUS à partir du promoteur de *lac Z* présent sur le plasmide BIN19. L'inversion de la cassette GUS par rapport au promoteur de *lac Z* diminue de 20 fois l'activité GUS mesurée [20].

Selon Caissard et Chriqui [8], lorsque de telles souches sont utilisées, le caractère transformé des cellules obtenues après inoculation ne peut être affirmé que par des études ultrastructurales en microscopie électronique, grâce à un protocole associant la cytoenzymologie ultrastructurale à des contrôles en microanalyse X. Avec ce protocole, il est alors possible de déterminer si l'activité GUS provient des cellules transformées ou des bactéries [9].

Pour éviter ce type d'analyse, des souches n'exprimant pas le gène GUS contenu sur leur plasmide binaire ont été développées. Ainsi, l'insertion d'un intron dans le gène de la β -glucuronidase a permis à Vancanneyt *et al.* [32] d'obtenir une souche ne montrant aucune activité GUS. En effet, seules les cellules eucaryotes sont capables du phénomène d'épissage nécessaire pour produire une enzyme fonctionnelle à partir de ce type de construction. Janssen et Gardner [18] ont également obtenu une construction permettant l'expression exclusive dans les cellules végétales transformées, en utilisant un gène GUS dépourvu de sites de fixation pour les ribosomes bactériens.

Cependant, la microscopie photonique nous a permis de montrer que la localisation des précipités bleus dans les cellules de cals d'*A. flava* provenant de boutures inoculées par *A. tumefaciens* était uniquement cytoplasmique, et qu'ils étaient absents aussi bien des espaces intercellulaires que des noyaux.

Enfin, chez *A. nilotica*, aucune activité GUS n'a été mise en évidence dans les cals formés sur milieu de sélection à partir des boutures inoculées. Deux hypothèses peuvent expliquer la non-détection d'une activité GUS : (1) *A. nilotica* n'est pas sensible à *A. tumefaciens* et n'a pas été transformé ou (2) il y a eu transformation mais le niveau d'expression du gène GUS dans les cellules des cals était trop faible pour permettre la mise en évidence de la transformation. La 2^e hypothèse permet d'expliquer la formation de cals sur milieu de sélection chez les boutures inoculées d'*A. nilotica*. Cependant, d'autres tests de sensibilité devront être effectués sur des tissus plus juvéniles considérés comme plus sensibles à *A. tumefaciens* [1]. En effet, la juvénilité des tissus végétaux semble être un facteur important pour la sensibilité aux agrobactéries. Chez deux espèces d'*Eucalyptus*, *E. gunnii* et *E. tetradonta*, seuls des organes très juvéniles de germination âgés au plus de 4 mois sont sensibles aux inoculations par *A. tumefaciens* ou *A. rhizogenes*.

En conclusion, la sensibilité de certaines espèces d'*Acacia* à *A. tumefaciens* nous

permet d'envisager la création de plantes fourragères transgéniques plus résistantes aux contraintes environnementales, et répondant ainsi aux besoins des pays arides, comme Djibouti, en matière de lutte contre le désertification.

Abréviations

ADN-T : ADN transféré ; ANA : Acide α -naphtylacétique ; CaMV : Virus de la mosaïque du chou-fleur (*cauliflower mosaic virus*) ; diX-indigo : 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo ; DO₆₀₀ : Densité optique à 600 nm ; cfu : *colony forming unit* ; GUS : β -glucuronidase ; MS : Milieu de Murashige et Skoog ; NOS : Nopaline synthétase ; NPT II : Néomycine phosphotransférase ; *vir* : région de virulence du plasmide Ti ; X-Glu : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide.

Références

1. Adam S, Chriqui D, Caissard JC (1991). Transformation génétique et régénération de bourgeons transgéniques chez *Eucalyptus gunnii*. Biotechnologies appliquées aux arbres forestiers. AFOCEL : 81-110.
2. Audru J, César J, Forgiarini G, Lebrun JP (1987). La végétation et les potentialités pastorales de la République de Djibouti. Maisons-Alfort : IEMVT : 384.
3. Audru J, Labonne M, Guérin H, Arun Bilha (1993). *Acacia nilotica*, son intérêt fourrager et son exploitation chez les éleveurs Afars de la vallée du Magdoul à Djibouti. *Bois et Forêts des Tropiques* 235 : 59-70.
4. Brasileiro ACM, Leplé JC, Muzzin J, Ounnoughi D, Michel M, Jouanin L (1991). An alternative approach for gene transfer in trees using wild-type *Agrobacterium* strains. *Plant Mol Biol* 17 : 441-452.
5. Brasileiro ACM, Tourneur C, Leplé JC, Combes V, Jouanin L (1992). Expression of the mutant *Arabidopsis thaliana* acetolactate synthase gene confers chlorsulfuron resistance to transgenic poplar plants. *Transgenic Res* 1 : 133-141.
6. Bray L, Chriqui D, Gloux K, Le Rudulier D, Meyer M, Peduzzi J (1991). Betaines and free amino acids in salt stressed vitroplants and resting buds of *Populus trichocarpa* x *deltoides*. *Physiol Plant* 83 : 136-143.
7. Bray L, Di Michele MN (1993). Réflexions sur la désertification et l'environnement. *Sci Env* 8 : 9-17.
8. Caissard JC, Chriqui D (1990). Ultrastructural visualization of β -glucuronidase activity in *Nicotiana tabacum* root apices harbouring the CaMV-GUS construct. *Plant Cell*, soumis.
9. Caissard JC (1993). Repérage ultrastructural de la β -glucuronidase sur des plantes transgéniques comportant le gène GUS : méthodologies et études de cas. Thèse Univ. Paris 6, 144 p.
10. Comité National pour l'Environnement (1991). Rapport National Environnement. Djibouti : ONTA/SPSE : 105.
11. Da Câmara Machado ML, da Câmara Machado A, Hanzer V, Weiss H, Regner F, Steinkellner H, Mattanovitch D, Plail R, Knapp E, Kalthoff B, Katinger H (1992). Regeneration of transgenic plants of *Prunus armeniaca* containing the coat protein gene of Plum Pox Virus. *Plant Cell Rep* 11 : 25-29.
12. De Cleene M, De Ley J (1976). The host range of crown gall. *Bot Rev* 42 : 389-464.
13. De Cleene M, De Ley J (1981). The host range of infectious hairy-root. *Bot Rev* 47 : 147-194.

14. De Framond H (1990). Valorisation des ressources génétiques forestières en République de Djibouti. *Revue de l'ISERST* 4 : 13-18.
15. Guivarc'h A (1990). Conséquences cellulaires de l'inoculation de disques racinaires de carotte par *Agrobacterium rhizogenes* ou *Agrobacterium tumefaciens* comportant le gène de la β -glucuronidase. DEA biologie et physiologie végétales Univ. Paris 6, 71 p.
16. Horsh RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985). A simple methode for transferring genes into plants. *Science* 227 : 1229-1231.
17. Jalludin M, Bray L, Atasi M, Gafaneh A, Zotskina E, Hirsch J, Houdart X, Weight D, Ali A (1993). Évaluation des ressources en eau et terre du site expérimental du cône de déjection de l'oued Atar. *Sci Env* 8 : 23-26.
18. Janssen BJ, Gardner RC (1989). Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. *Plant Mol Biol* 14 : 61-72.
19. Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D (1986). β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 8447-8451.
20. Jefferson RA (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS fusion system. *Plant Mol Biol Reporter* 4 : 387-405.
20. Lebrun JP, Audru J, César J (1989). Catalogue des plantes vasculaires de la République de Djibouti. Maisons-Alfort : IEMVT : 277.
21. Leplé JC, Brasileiro ACM, Michel MF, Delmotte F, Jouanin L (1992). Transgenic poplars : expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Rep* 11 : 137-141.
22. Leplé JC (1993). Transformation génétique de peupliers hybrides par *Agrobacterium tumefaciens*. Application à la résistance aux insectes. Thèse Univ. d'Orléans, 134 p.
23. Le Rudulier D, Strom AR, Dandekar AM, Smith LT, Valentine RC (1984). Molecular biology of osmoregulation. *Science* 224 : 1064-1068.
24. McCown BH, McCabe DE, Russell DR, Robinson DJ, Barton KA, Raffa KF (1991). Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particule acceleration. *Plant Cell Rep* 9 : 590-594.
25. Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium of rapid growth and assays within tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
26. Nielsen JE, Joerbo MJ, Andersen JM, Hansen B, Okkels FT (1988). The histochemical GUS assay for plant transformation, detection of background reaction in untransformed tissue from several species. Congrès Eucarpia, Helsingør (Danemark), 11-16 sept.
27. Nitsch JP, Nitsch C (1965). Néof ormation de fleurs *in vitro* chez une espèce de jours courts : *Plumbago indica* L *Ann Physiol Veg* 7 : 251-256.
28. Odingo RS (1990). The definition of desertification : its programmatic consequences for UNEP and the international community. *Desertification Control Bulletin* 18 : 31-50.
29. Tarczynski MC, Jensen RG, Bohnert HJ (1992). Expression of a bacterial *mtlD* gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 2600-2604.
30. Tarczynski MC, Jensen RG, Bohnert HJ (1993). Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* 259 : 508-510.
31. UNESCO (1977). Carte de répartition mondiale des régions arides.
32. Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M (1990). Construction of an intron-containing marker gene ; splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* 220 : 245-250.
33. Walden R (1988). Vectors based on the Ti and Ri plasmid of *Agrobacterium*. In *Genetic transformation in plants*. Open University Press, Biotechnologies Series : 28-35.
34. Weising K, Schell J, Khal G (1988). Foreign genes in plants : transfer, structure, expression, and applications. *Annu Rev Genet* 22 : 421-477.
35. Wullems GJ, Molendijk L, Ooms G, Schilperoort RA (1981). Retention of tumor markers in F1 progeny plants from *in vitro* induced octopine and nopaline tumor tissues. *Cell* 24 : 719-727.

49

Expression chez *Brassica napus* d'une stérilité mâle génique obtenue par génie génétique. Comparaison avec trois autres stérilités mâles géniques

M. DENIS¹, J.-P. GOURRET², R. DELOURME¹, C. MARIANI³, M. RENARD¹

1. INRA, Centre de Recherche de Rennes, Station d'Amélioration des Plantes, BP 29, 35650 Le Rheu, France.

2. Laboratoire de Biologie Cellulaire, Université de Rennes I, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes, France.

3. Plant Genetic Systems NV, J. Plateauststraat 22, 9000 Gent, Belgique.

Résumé

L'expression chez Brassica napus d'une stérilité mâle génique obtenue par transfert de gène [20] a été comparée à trois autres stérilités mâles géniques [24] (Schuster, non publié ; Rakow, non publié).

Dans les 4 cas, une réduction du filet des étamines et une indéhiscence des anthères sont observées. Pour la stérilité mâle obtenue par génie génétique, le blocage de la microsporogénèse se produit après la libération des microspores hors de la callose, et conduit à la présence d'un amas d'exines vides aplaties dans les anthères. Cette situation est également observée pour les stérilités découvertes par Shuster et Rakow. Pour la stérilité de Takagi, l'arrêt de la microsporogénèse se situe au stade « microspores sous callose » et se traduit par la présence d'un amas de callose dans les anthères.

De par cette étude, il apparaît que la stérilité mâle génique obtenue par transfert de gène s'exprime chez le colza de façon identique à des stérilités mâles géniques apparues spontanément.

L'expression d'une stérilité mâle génique obtenue par génie génétique [20] a été étudiée chez *Brassica napus*. Le gène transféré consiste en un gène codant pour une ribonucléase, sous le contrôle d'un promoteur spécifique du tapis des anthères. A titre comparatif, trois autres stérilités mâles géniques ont été étudiées chez *Brassica napus* : deux stérilités apparues spontanément (découvertes respectivement par W. Schuster et par G. Rakow, non publiés) et une stérilité induite par irradiation avec des rayons gamma [24].

Matériels et méthodes

Matériels

Pour la stérilité obtenue par transfert de gène, la variété Drakkar (variété double zéro de Colza de printemps) a été transformée selon la méthode de De Block *et al.* [3]. L'étude de la stérilité mâle a été réalisée sur la première génération (T1) obtenue à partir du rétrocroisement de 7 transformants primaires avec des plantes de Drakkar fertile. Les transformants primaires contiennent la construction pTA29-*RNAse T1* [20]. Le gène transféré, *RNAse T1*, consiste en un gène codant pour une ribonucléase. Ce gène est sous le contrôle d'un promoteur, pTA29, spécifique du tapis des anthères.

Les trois autres stérilités géniques se référant aux travaux de Takagi, Schuster et Rakow ont été étudiées sur des plantes provenant de parcelles de rétrocroisement avec les variétés de colza Bienvenu (lignée 0+), Jetneuf (lignée 0+), Darmor (lignée 00) et Samourai (lignée 00).

Dans tous les cas, les plantes fertiles de la variété Drakkar ont servi de témoin.

Conditions de culture

Les transformants, après germination, ont été placés pendant 3 semaines en serre, puis pendant 3 semaines en chambre de vernalisation à 4 °C, 8h/4h jour/nuit. Après la phase de vernalisation, les plantules ont été transférées dans des grands pots et placées en serre jusqu'à la floraison.

Les stérilités mâles géniques, naturelles ou obtenues par mutagenèse, ont été étudiées sur des plantes en parcelles de rétrocroisement mises en place dans la pépinière d'hiver 1989-1990 à l'INRA du Rheu.

Caractérisation morphologique et cytologique des plantes mâles stériles

• Observation par microscopie électronique à balayage

En complément de l'observation visuelle, les fleurs mâles stériles et fertiles ont été comparées par microscopie électronique à balayage. Des pièces florales ou des fleurs entières ont été fixées, déshydratées par la méthode du point critique et ensuite observées après métallisation des échantillons avec de l'or [13]. Cette technique a également permis d'observer le contenu des anthères.

• *Étude de la microsporogénèse*

La coloration Alexander [1] a été utilisée pour déterminer rapidement le stade de blocage de la microsporogénèse chez les plantes mâles-stériles. Les étamines ou les boutons ont été écrasés entre lame et lamelle dans une goutte du colorant Alexander, et observés au microscope photonique directement ou après une nuit à 30 °C.

Pour l'observation d'échantillons fixés dans la résine, les anthères à différents stades de développement ont été fixées dans le glutaraldéhyde (2,5 %, w/v) pendant 14 h à 4 °C. Après lavage au tampon cacodylate 0,1 M, les pièces ont été post-fixées dans du tétroxyde d'osmium (1 %, w/v) pendant 2 h puis relavées au tampon cacodylate. Après déshydratation dans une série d'alcool à concentration croissante puis d'oxyde de propylène, les échantillons ont été déposés de façon orientée dans de l'épon fluide additionné de catalyseur. Les blocs de résine polymérisée ont été obtenus en 48 h à 60 °C. Les coupes semi-fines (1µm) obtenues à partir de chaque échantillon ont été colorées au bleu de toluidine et montées dans de la résine pour l'observation au microscope photonique [19].

Résultats

Observation visuelle

Dans les quatre cas de stérilités mâles, les plantes mâles-stériles peuvent être reconnues avant floraison du fait que leurs boutons floraux présentent un plus petit diamètre par rapport à ceux des plantes fertiles. A floraison, l'observation des fleurs entières montre, pour le colza fertile, que les étamines déhiscents sont de longueur égale ou supérieure au stigmate. Cela n'est pas le cas pour les fleurs mâles stériles qui pour les 4 stérilités montrent une réduction de longueur du filet des étamines et une indéhiscence des anthères.

Observation au microscope électronique à balayage (MEB)

Les observations au MEB confirment les observations visuelles. Elles ont permis également d'observer qu'il n'y avait pas de différences de développement des nectaires entre les fleurs mâles-stériles et mâles-fertiles.

A l'anthèse, l'observation du contenu des anthères par MEB montre la présence de grains de pollen arrondis dans les anthères fertiles. Les épaisissements de l'assise mécanique ainsi que les 3 apertures des grains de pollen sont facilement discernables.

Pour la stérilité obtenue par génie génétique, les anthères contiennent un amas d'exines vides aplaties. La coloration Alexander confirme l'absence de cytoplasme. Ce même type d'amas dans les anthères est également observé pour les stérilités de Schuster et de Rakow. Alors que pour la stérilité de Takagi, des masses arrondies sont observées dans les sacs polliniques et correspondraient à des tétrades de microspores sous callose.

Microsporogénèse

L'étude de la microsporogénèse par l'observation de coupes semi-fines colorées au bleu de toluidine a permis de définir le stade de blocage de la microsporogénèse pour

les quatre stérilités mâles. La microsporogenèse chez le colza fertile a été décrite par Grant *et al.* [12]. Le blocage de la microsporogenèse pour la stérilité mâle obtenue *via* le transfert de gènes (Figure 1) se situe au stade « microspores vacuolisées ». Les cellules tapétales sont hétérogènes de par leur forme et leur coloration au bleu de toluidine. Une lyse précoce du contenu du tapis parallèle à celle du contenu des microspores conduit à la présence d'exines vides et aplaties dans les anthères. Ces phénomènes sont similaires à ceux observés pour les stérilités de Schuster et de Rakow. La stérilité de Takagi (Figure 2) est marquée par une vacuolisation importante du tapis au stade « tétrade » et une irrégularité dans la forme des tétrades. Par la suite, il y a dégénérescence des microspores sous callose et du tapis conduisant finalement à la présence d'un amas callosique dans les anthères.

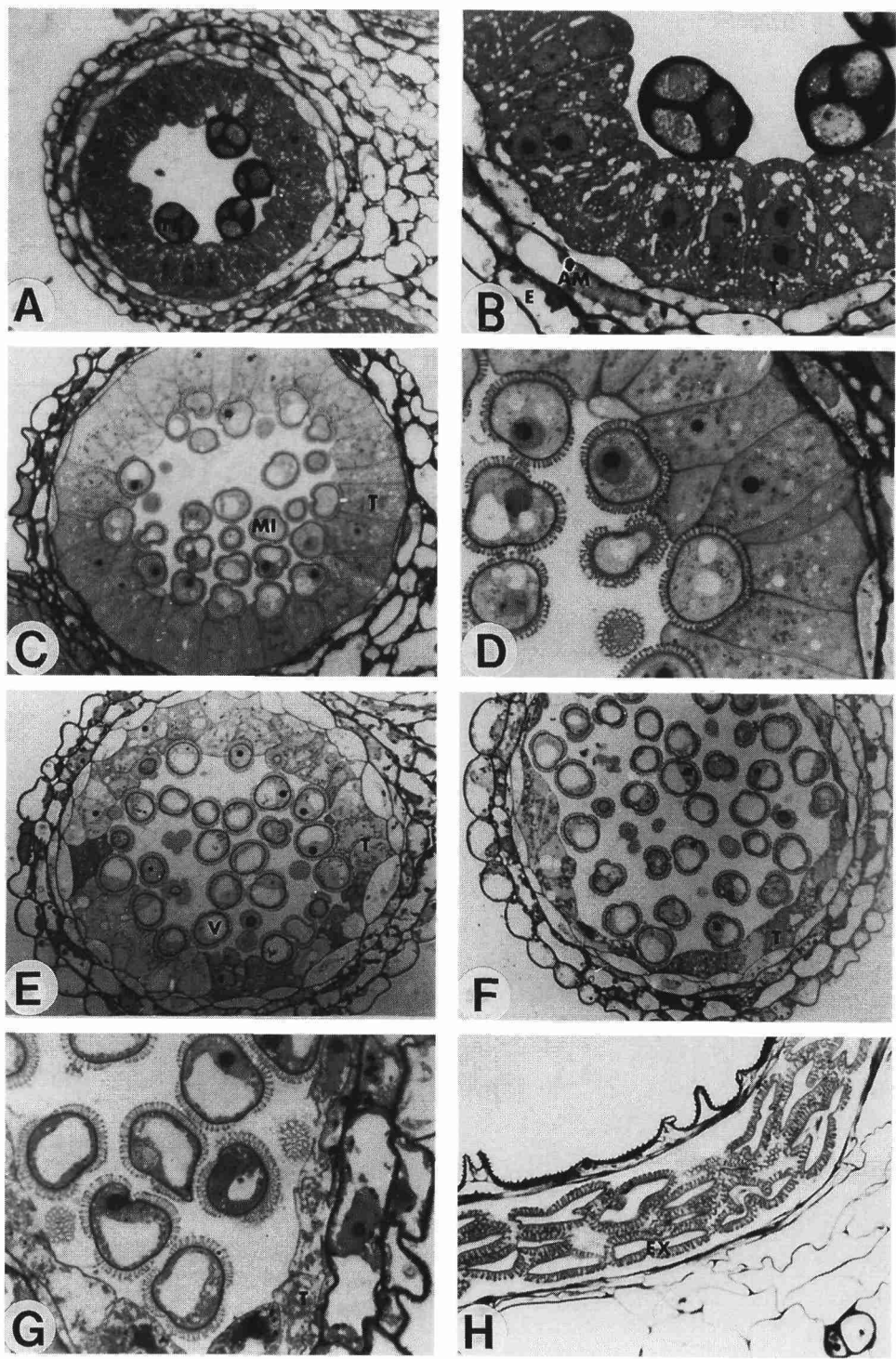
Étude de la stabilité de la stérilité mâle

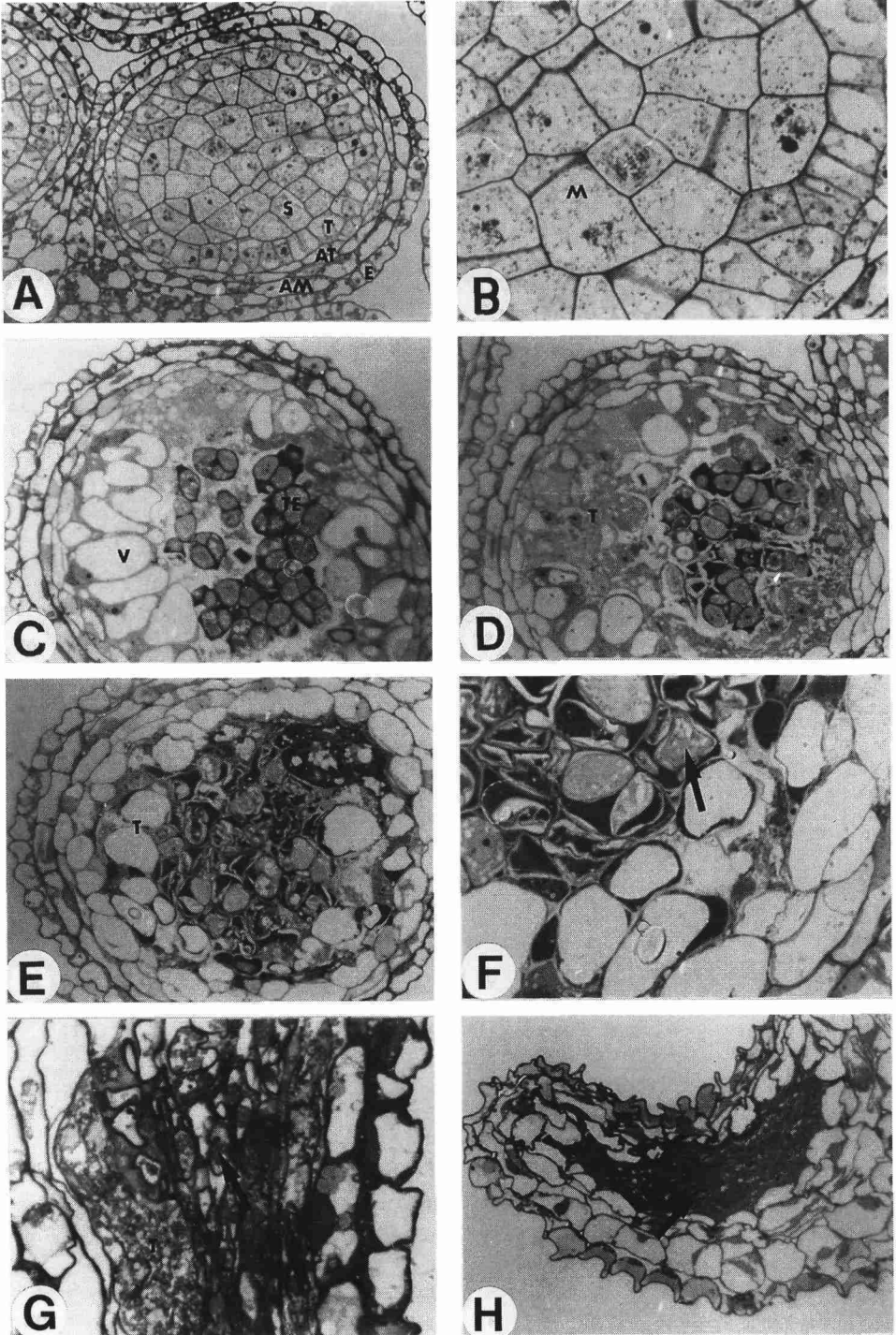
Au cours des précédentes manipulations, une instabilité de la stérilité mâle a été observée pour certains transformants ayant le gène *RNAse T1* et pour quelques génotypes, pour les stérilités mâles découvertes par Schuster et Rakow.

Cette instabilité est liée à une augmentation de la température pour la stérilité *RNAse T1* et à une diminution de la température pour les stérilités de Schuster et de Rakow [4].

Cette instabilité dans les trois cas s'exprime par une elongation du filet des étamines, une déhiscence des anthères, et la présence d'un mélange de 3 types de grains de pollen dans les anthères : des grains d'apparence normale, des grains de petite taille et des exines aplaties. De plus, en cas d'instabilité de la stérilité mâle de Rakow, certaines exines et certains pollens sont recouverts d'un manteau d'aspect granuleux. La coloration Alexander a montré la présence de cytoplasme dans les grains de pollen d'apparence normale.

Figure 1. Microsporogenèse de la stérilité mâle obtenue par transfert de gène. Les coupes observées représentent des coupes transversales de loge pollinique. A : tétrade de microspores (TE) x 370. B : tétrades à côté du tapis ; 3 des 4 microspores sous callose sont visibles ; les cellules tapétales sont binuclées (T) (É : épiderme, AM : assise mécanique) x 930. C : microspores à petites vacuoles (MI) ; les cellules tapétales sont de forme régulière (T) x 370. D : détail de la photo précédente ; les plastas autour du noyau du tapis sont très petits comparés à Drakkar fertile x 930. E : microspores à noyau excentré et à grande vacuole (V) ; les microspores ont pris une forme arrondie ; les cellules tapétales (T) sont de forme irrégulière x 370. F : début de la dégénérescence du contenu des microspores, le tapis a diminué fortement de taille (T) et son contenu commence à dégénérer x 370. G : les micropores commencent à se déformer, la dégénérescence de leur contenu s'accroît ainsi que celle du tapis (T) x 930. H : exines vides aplaties (EX) dans une loge pollinique affaissée, le tapis a totalement disparu ; aucun épaissement n'est visible dans la couche sous-épidermique x 930.





Discussion

Le gène transféré dans *Brassica napus* conduit à une stérilité mâle qui, de par la morphologie florale, le blocage de la microsporogénèse et l'instabilité de la stérilité mâle chez certains transformants, s'exprime identiquement à des stérilités mâles géniques naturelles.

La réduction du filet des étamines est fréquente chez les plantes de colza mâles-stériles [25], et est certainement corrélée avec l'arrêt de la microsporogénèse. La réduction du filet des étamines et l'indéhiscence des anthères ont été également observées par Gourret *et al.* [11] dans les cybrides de *B. napus*, dans le cas de la stérilité mâle cytoplasmique *ogu*.

L'indéhiscence des anthères chez les 4 stérilités mâles étudiées pourrait être corrélée avec l'absence d'épaississement de lignine de l'assise mécanique, assise qui est impliquée dans la déhiscence des anthères [23].

Dans trois des quatre stérilités mâles étudiées, l'arrêt de la microsporogénèse se produit après la libération des microspores hors de la callose. Cela conduit à une masse d'exines vides aplaties dans les anthères. Cette accumulation d'exines vides a été également observée pour d'autres stérilités mâles de colza telles que chez la CMS *Raphanus*, les lignées Janpol, NPZ [25] et chez la CMS *ogu* [11]. Pour la stérilité mâle de Takagi, il apparaît que le blocage de la microsporogénèse se situe plus précocement que dans le cas des trois autres stérilités mâles étudiées. Cet arrêt précoce se traduit par un amas de callose dans les anthères. Une semblable dégénérescence de la microsporogénèse a été observée chez le tournesol par Horner [17].

Il devient évident que les lésions du tapis jouent un rôle important dans l'avortement du pollen [9, 10, 11, 16, 17]. Un rôle trophique a été attribué au tapis [5, 6, 14, 21, 26] ; ce dernier produit nombre de protéines et de substances qui aident au développement du pollen et/ou deviennent des composés de la paroi du pollen [7, 18].

Chez la stérilité mâle obtenue par transfert de gène, l'arrêt de la microsporogénèse est liée à l'activité du gène chimère *TA29-RNAse T1*. L'activité ribonucléasique au sein du tapis perturbe le métabolisme cellulaire dont la synthèse protéique de celui-ci, et engendre, par conséquent, une dégénérescence précoce du tapis. Ce dernier ne peut plus alors jouer son rôle vis-à-vis des microspores, ce qui conduit à leur dégénérescence. Dans ce cas, il est supposé que la dégénérescence du tapis est la cause de la dégénérescence des microspores ; mais il est également possible que, en plus de ce phéno-

Figure 2. Microsporogénèse de la stérilité obtenue par mutagenèse. Les coupes observées représentent des coupes transversales de la loge pollinique. A : massif sporogène (E : épiderme, Am : assise mécanique, AT : assise transitoire, T : tapis, S : cellule sporogène) x 370. B : méiocytes en prophase I (m) x 930. C : tétrades (TE), les tétrades sont de forme irrégulière et le tapis est fortement vacuolisé (V) x 370. D : le tapis (T) de plus en plus important envahit la loge pollinique coinçant au centre les tétrades x 370. E : le contenu des microspores sous callose commence à dégénérer (T : tapis) x 370. F : détail de la photo précédente, la flèche indique le contenu d'une microspore x 930. G : le contenu des microspores sous callose a pratiquement disparu (flèche), le tapis (T) toujours présent commence à dégénérer x 930. H : loge pollinique affaissée avec au centre un amas de callose (flèche), le tapis a disparu, les épaississements de l'assise mécanique ne sont pas visibles x 370.

mène, il y ait transfert de la ribonucléase du tapis dans les microspores accélérant ainsi le processus de dégénérescence de celles-ci.

Une instabilité de la stérilité mâle a été observée pour trois des quatre stérilités mâles géniques. Dans les trois cas, l'instabilité s'exprime morphologiquement de façon identique. L'instabilité a été notée pour des températures élevées dans le cas de la stérilité mâle obtenue par transfert de gène [4]. Fan et Stefansson [8] ont observé que la même instabilité apparaît pour les CMS *nap* et *pol* dans les mêmes conditions de culture. Au contraire, chez les stérilités de Schuster et de Rakow, l'instabilité de la stérilité mâle a été observée à des températures basses (11°-16 °C). Bien que Salako [22] ait calculé une corrélation de 0,85 entre le test de fertilité et la coloration Alexander, la fertilité des pollens produits par les plantes instables devrait être étudiée plus en détail à l'aide d'autres techniques [2, 15] et de croisements.

Dans le cas de la stérilité obtenue par génie génétique, nous sommes incapables à ce jour de savoir sur quelles causes repose l'instabilité ; les facteurs environnementaux influencent-ils l'activité du promoteur ou déstabilisent-ils la ribonucléase ? Il est à noter que l'instabilité a été observée pour certains transformants et qu'il a été possible d'isoler des transformants ayant une stabilité de la stérilité mâle dans toutes les conditions étudiées.

Références

1. Alexander MP (1969). Differential staining of aborted pollen and non-aborted pollen. *Stain Technol* 44 : 117-122.
2. Coleman AW, Goff LJ (1985). Applications of fluorochromes to pollen biology. I. Mithramycin and 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as vital stains and for quantification of nuclear DNA. *Stain Technol* 60 : 146-154.
3. De Block M, Debrouwer D, Tenning P (1989). Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in transgenic plants. *Plant Physiol* 91 : 694-701.
4. Denis M, Delourme R, Gourret J-P, Renard M (1993). Expression of engineered nuclear male sterility in *Brassica napus*. Genetics, morphology, cytology and sensitivity to temperature. *Plant Physiol* 101 : 1295-1304.
5. Dickinson HG (1973). The role of plastids in the formation of pollen grain coatings. *Cytobios* 8 : 25-40.
6. Echlin P (1971). The role of tapetum during microsporogenesis of angiosperms. In : Heslop-Harrison, ed. *Pollen development and physiology*. Butterworths, London : 41-61.
7. Esau K (1977). *Anatomy of Seed Plants*, ed 2. John Wiley, New York.
8. Fan Z, Stefansson BR (1986). Influence of temperature on sterility of two cytoplasmic male sterility systems in rape (*Brassica napus* L.). *Can J Plant Sci* 66 : 221-227.
9. Filion WG, Christie BR (1986). The mechanism of male sterility in a clone of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Crop Sci* 6 : 345-347.
10. Gourret J-P, Pellán-Delourme R, Renard M (1987). Light and microscopic study of radish cytoplasmic male sterility in *Brassica napus*. In : Proceedings of the 7th international Rape-seed conference. Poznan. 192-195.
11. Gourret J-P, Delourme R, Renard M (1992). Expression of *ogu* cytoplasmic male sterility in cybrids of *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 83 : 549-556.
12. Grant I, Beversdorf WD, Peterson RL (1986). A comparative light and electron microscopic study of microspore and tapetal development in male fertile and cytoplasmic male sterile oilseed rape (*Brassica napus*). *Can J Bot* 64 : 1055-1068.

13. Hayat MA (1978). Introduction to biological scanning electron microscopy. University Park Press, Baltimore.
14. Heslop-Harrison J (1968). Tapetal origin of pollen-coat substances in *Lilium*. *New Phytol* 67 : 779-789.
15. Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y, Shivana HR (1984). The evaluation of pollen quality and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theor Appl Genet* 67 : 367-375.
16. Horner HT, Rogers MA (1974). A comparative light and electron microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile pepper (*Capsicum annuum*). *Can J Bot* 52 : 435-441.
17. Horner HT (1977). A comparative light and microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile sunflower (*Helianthus annuus*). *Am J Bot* 64 : 745-759.
18. Knox RB (1979). Pollen and allergy. Arnold, London.
19. Lynn JA (1965). Rapid toluidine blue staining of embedded and mounted « adjacent » sections. *Am J Clin Pathol* 44 : 57-58.
20. Mariani C, De Beuckeleer M, Truettner J, Leemans J, Goldberg RB (1990). Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347 : 737-741.
21. Mascarenhas JP (1975). The biochemistry of angiosperm pollen development. *Bot Rev* 41 : 259-314.
22. Salako S (1970). La stérilité mâle en sélection. Création d'hybrides. Cas particulier de la féverole. Mémoire de Fin d'Études. École Nationale Supérieure des Sciences Agronomiques Appliquées, Dijon.
23. Souvré A, Albertini L, Audran JC (1987). Le grain de pollen des Angiospermes. Apports de la biopalynologie et perspectives biotechnologiques. *Bull Soc Bot Fr Actual Bot* 1 : 87-112.
24. Takagi Y (1970). Monogenic recessive male sterility in oil rape (*Brassica napus* L.) induced by gamma irradiation. *Z Pflanzenzuecht* 64 : 242-247.
25. Theis R, Robbelen G (1990). Anther and microspores development in different male sterile lines or oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Angew Bot* 64 : 419-434.
26. Vasil IK (1967). Physiology and cytology of anther development. *Biol Rev* 42 : 327-373.

50

La stérilité mâle cytoplasmique chez la chicorée industrielle : obtention par fusion de protoplastes et caractérisation moléculaire

C. RAMBAUD, A. BELLAMY, J. VASSEUR

Laboratoire de physiologie cellulaire et morphogenèse végétale, Université des sciences et technologies de Lille, 59655 Villeneuve-d'Ascq, France.

Résumé

Des chicorées mâles-stériles ont été obtenues par fusion de protoplastes de mésophylle de chicorée fertile et de protoplastes d'hypocotyles de tournesol mâle-stérile. Ces plantes mâles-stériles présentent quatre types de morphologie florale. L'analyse du génome mitochondrial de 10 plantes mâles-stériles par hybridation moléculaire avec des sondes spécifiques de ce génome met en évidence qu'il y a eu des recombinaisons mitochondriales entre la chicorée et le tournesol. Ces plantes sont toutes différentes les unes des autres d'un point de vue mitochondrial et l'intensité des réarrangements peut être corrélée avec le degré de stérilité des plantes. L'analyse des descendances montre qu'une stabilisation du génome mitochondrial s'effectue au cours des générations et qu'à la quatrième génération, des fragments spécifiques du tournesol mais aussi de nouveaux fragments qui témoignent de la recombinaison des génomes mitochondriaux sont encore présents.

La stérilité mâle cytoplasmique est un caractère qui s'exprime par une déficience dans le processus de la gamétogenèse mâle, elle aboutit à un avortement des organes reproducteurs mâles. Elle présente un grand intérêt agronomique car elle permet d'éviter la

castration manuelle nécessaire à la création d'hybrides dont les rendements sont très nettement supérieurs à ceux des lignées parentales. Son hérédité est de type maternel, elle permet donc la protection des nouvelles obtentions. Elle peut théoriquement apparaître spontanément dans la nature ou être obtenue par croisements intra- ou interspécifiques, et comme elle résulte d'interactions entre le génome mitochondrial (mt) et le génome nucléaire, il est possible de l'obtenir par fusion de protoplastes.

Chez la chicorée, la stérilité-mâle cytoplasmique n'existe pas et tous les essais de croisements intra- ou interspécifiques qui ont été entrepris jusqu'à présent n'ont jamais abouti (M. Desprez, communication personnelle). Nous avons donc décidé de l'induire en faisant fusionner les protoplastes de chicorée avec ceux d'une autre espèce. Des chicorées mâles-stériles ont été obtenues ; leur caractérisation moléculaire ainsi que l'étude de la transmission de ce caractère dans les descendance ont été entreprises dans le but de déterminer l'origine de cette stérilité-mâle.

Choix d'un partenaire de fusion

Il a fallu choisir un partenaire de fusion qui soit susceptible d'induire la stérilité chez la chicorée. Bien que la stérilité mâle cytoplasmique ne soit pas attribuable à un gène spécifique, nous avons choisi un partenaire de fusion qui possède des lignées mâles-stériles cytoplasmiques. Notre choix a aussi été déterminé par la distance phylogénétique entre les deux espèces à fusionner. Il fallait trouver une espèce qui soit suffisamment proche de la chicorée pour permettre la recombinaison des deux génomes mitochondriaux, mais il fallait aussi que cette espèce soit suffisamment éloignée de la chicorée pour empêcher la fusion des deux noyaux. Nous avons donc choisi le tournesol comme partenaire de fusion. Le tournesol présente un autre avantage ; ses protoplastes sont en effet incapables de régénérer des plantes dans nos conditions de culture.

Optimisation des conditions de régénération des protoplastes de chicorée

Les protoplastes de chicorée sont obtenus à partir de feuilles de jeunes plantules cultivées *in vitro*. Les conditions de culture de ces plantes ont été étudiées dans le but d'optimiser les rendements en divisions des protoplastes, mais aussi les rendements en cals et en plantes régénérées.

Les rendements les meilleurs (6 % de cals après 2 mois de culture) ont été obtenus en cultivant les plantules dans les conditions suivantes :

- photopériode : 16 h de lumière/8 h d'obscurité,
- intensité lumineuse : $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, c'est-à-dire le plus près possible de la source lumineuse,
- qualité de la lumière : tubes fluorescents DeLuxe Cool White.

L'âge des plantes est aussi un facteur déterminant ; plus les plantules sont jeunes, meilleurs sont les rendements. Des plantules âgées de 11 à 13 jours sont donc utilisées pour la préparation des protoplastes de chicorée.

La composition des milieux de culture a aussi été étudiée [4] et des conditions optimales ont été déterminées.

Technique de fusion et sélection des hétérocaryons

Nous utilisons une méthode classique de fusion au polyéthylène glycol (PEG) associé à des ions Ca^{2+} ; mais c'est notamment grâce à l'addition de diméthylsulfoxyde (DMSO) dans la solution de PEG que les rendements en hétérocaryons obtenus sont de l'ordre de 25 %.

Pour sélectionner les hétérocaryons des protoplastes non fusionnés, les produits de fusion sont prélevés manuellement à l'aide d'une micropipette et cultivés à faible densité, dans des petits puits de culture renfermant 100 μl de milieu de culture modifié [5]. Des cals, puis des plantes ont ainsi pu être régénérés.

Caractérisation des plantes obtenues

Par cette technique, nous avons obtenu environ 600 plantes qui sont toutes des chicorées et parmi lesquelles 16 présentent une stérilité qui s'exprime différemment selon les plantes.

Quatre types de fleurs ont été observés (Figure 1) :

- des fleurs avec des anthères brunes non déhiscentes et qui renferment du pollen non viable, mis en évidence par le test d' Alexander [1],
- des fleurs avec des anthères brunes avortées et qui ne renferment pas de pollen,
- des fleurs sans anthères,
- des fleurs sans anthères et dont les styles sont soit réduits, soit complètement inexistant, ces fleurs sont complètement stériles.

Pour connaître l'origine de ces stérilités, pour savoir si elles sont bien dues à la fusion de protoplastes ou tout simplement à des variations somaclonales mais aussi pour savoir si elles sont d'origine nucléaire ou cytoplasmique, un programme de croisements a été entrepris par les sélectionneurs (Ets Florimond-Desprez) dans le but de connaître le mode de transmission de ce caractère dans les descendance. Parallèlement, la stérilité-mâle cytoplasmique étant attribuable au génome mt, nous avons entrepris une caractérisation moléculaire de ces différentes plantes mâles-stériles obtenues par fusion de protoplastes.

Dans le but de rechercher du polymorphisme dans les fragments de restriction de l'ADN mt, nous avons réalisé des hybridations moléculaires avec 6 sondes spécifiques de ce génome (*coxI*, *coxII*, *coxIII*, *atpA*, *atp6* et *cob*). L'analyse a été faite sur de l'ADN total de chicorée fertile, de tournesol mâle-stérile et de 10 plantes obtenues par fusion de protoplastes. Divers résultats ont été obtenus : lorsque l'on hybride avec le gène *coxI*, on n'observe aucune différence entre la chicorée fertile et les chicorées mâles-stériles quelle que soit l'enzyme utilisée. Les résultats sont totalement différents lorsque l'on hybride avec les 5 autres sondes. Les couples d'enzyme/sonde *EcoRI/coxII* et *BamHI/atp6* permettent de résumer la situation [6].

Il ressort de cette analyse que ces 10 chicorées mâles-stériles obtenues par fusion de protoplastes sont toutes différentes les unes des autres et sont différentes de la chicorée fertile d'un point de vue ADN mt. Chez les plantes mâles-stériles, des fragments d'ADN mt spécifiques du tournesol sont présents, ce qui prouve que ces plantes sont bien issues de la fusion des protoplastes de tournesol et de chicorée. L'ADN mt de ces plantes est également caractérisé par la présence de nouveaux fragments d'ADN qui ne

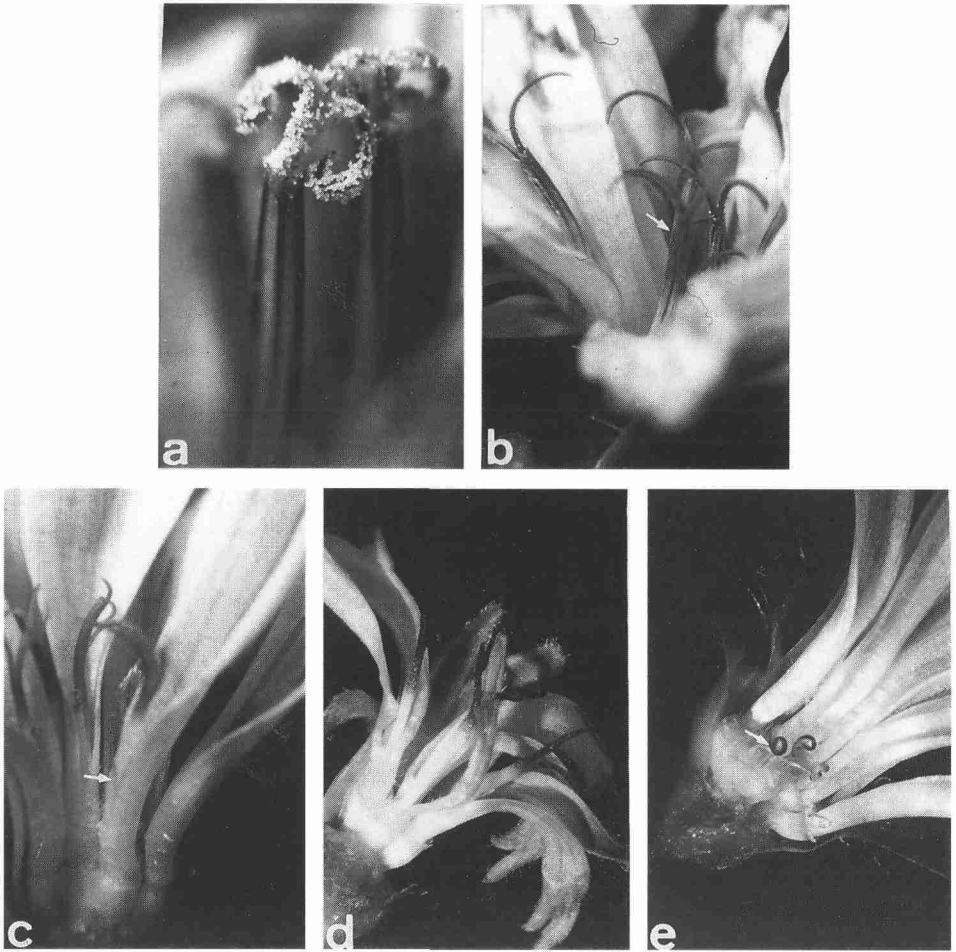


Figure 1. Différents types de fleurs observés chez les plantes obtenues par fusion de protoplastes. a. fleur fertile ; b. fleurs mâles-stériles avec anthères non déhiscentes renfermant du pollen non viable ; c. fleurs mâles-stériles avec anthères brunes sans pollen ; d. fleurs mâles-stériles sans anthères ; e. fleurs stériles avec styles avortés et sans anthères.

sont présents ni chez la chicorée fertile, ni chez le tournesol et qui témoignent de la recombinaison des 2 génomes mitochondriaux du tournesol et de la chicorée fertile. Cette analyse a aussi permis de montrer qu'il existe une relation entre la vigueur des plantes et l'intensité des recombinaisons : plus les recombinaisons sont importantes (c'est-à-dire perte de fragments spécifiques de la chicorée fertile) moins les plantes sont vigoureuses.

L'analyse des croisements entrepris par les sélectionneurs a permis de confirmer que l'origine du caractère de stérilité-mâle était bien cytoplasmique. Elle a été faite plus particulièrement sur une plante ; parmi les 16 qui ont été obtenues par fusion de protoplastes, cette plante est la plus vigoureuse et elle a l'avantage de présenter une stérilité-mâle de type « sans anthères ». Cela est un avantage pour les sélectionneurs qui ne doivent pas faire de test de viabilité pour confirmer la stérilité des plantes. Cette plante a été croisée avec divers pollinisateurs.

En première génération, une descendance très hétérogène d'un point de vue phénotypique a été observée (Tableau I). Sur 373 plantes, on a dénombré 21,7 % de plantes fertiles, 64,6 % de plantes mâles-stériles mais présentant 2 types de morphologies florales : « avec anthères brunes » ou « sans anthères » et aussi 13,7 % de plantes complètement stériles. Dans les générations suivantes, les différents types de morphologie florale ont été retrouvés mais dans des proportions différentes : en troisième génération, sur 2 695 plantes observées, la proportion des plantes fertiles n'est plus que de 2,2 %, et la majorité des plantes (52,8 %) présente une stérilité-mâle de type « sans anthères ». Ces résultats vont dans le sens d'une stabilisation du caractère mâle-stérile.

Tableau I. Répartition des différents types de morphologie florale dans les plantes de 1^{re}, 2^e et 3^e générations issues d'une chicorée mâle-stérile obtenue par fusion de protoplastes (plante n° 6).

	Fleurs fertiles	Fleurs mâles-stériles avec anthères brunes	Fleurs mâles-stériles sans anthères	Fleurs stériles
1 ^{re} génération 373 plantes	21,7 %	34 %	30,6 %	13,7 %
2 ^e génération 5 689 plantes	4,3 %	36 %	44,4 %	15,3 %
3 ^e génération 2 695 plantes	2,2 %	36,3 %	52,8 %	8,7 %

Analyse RFLP des descendance

Dans le but de confirmer la stabilisation du caractère mâle-stérile dans les descendance, une analyse RFLP a été entreprise sur ces plantes. Une première étude (Figure 2) a été faite sur des plantes prélevées au hasard dans les deuxième et troisième générations et en les comparant à la plante mère obtenue par fusion de protoplastes et maintenue par culture *in vitro*.

Dans la première analyse effectuée sur 10 produits de fusion mâles-stériles, le gène *cob* s'hybridait avec 5 fragments *Bam*HI chez la plante n° 6 (Figure 2). Une nouvelle

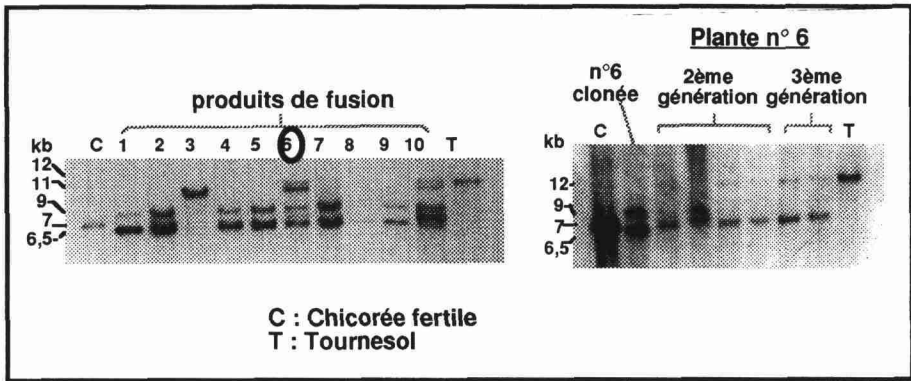


Figure 2. Analyse des descendance par RFLP. ADN total digéré par *Bam*HI et hybridé avec le gène *cob*.

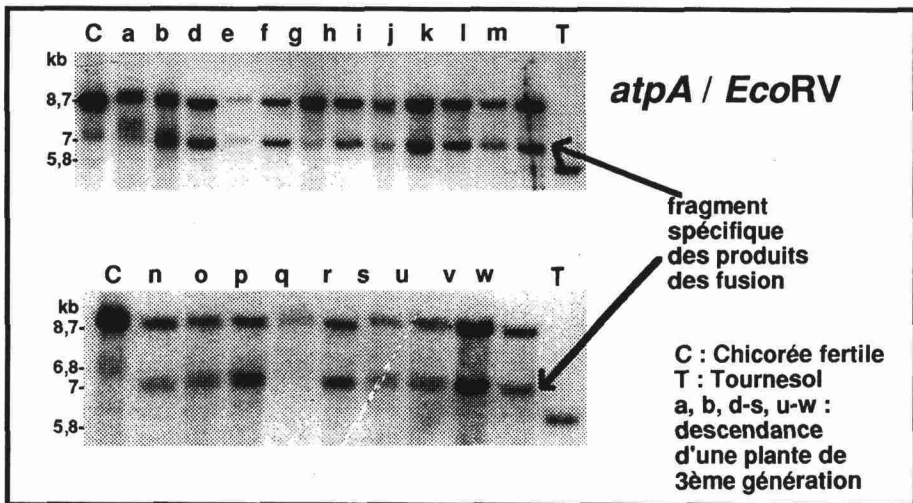


Figure 3. Analyse de la descendance d'une plante mâle-stérile de 3^e génération. ADN total digéré par *Eco*RV et hybridé avec le gène *atpA*.

analyse entreprise chez cette plante a mis en évidence que le maintien du clone de cette plante pendant 3 ans en culture *in vitro* a été accompagné de remaniements du génome mt puisque le gène *cob* ne s'hybride plus qu'avec 2 fragments *Bam*HI. Des réarrangements se sont aussi effectués au cours des générations ; on observait de la variabilité en 2^e génération, mais en 3^e génération le génome mt avait tendance à se stabiliser.

Le nombre de plantes étudiées dans cette analyse étant trop faible pour en tirer des conclusions quant à la stabilité du génome mt, nous avons entrepris d'analyser la descendance d'une seule plante de 3^e génération. Les premiers résultats vont dans le sens d'une stabilisation du génome. Deux constatations importantes émergent de cette analy-

se : les plantes mâles-stériles de 4^e génération ont conservé des fragments d'ADN mt spécifiques du tournesol et elles ont aussi conservé des séquences d'ADN qui leur sont propres et qui sont spécifiques de la recombinaison. C'est le cas d'une région du génome mt renfermant le gène *atpA* (Figure 3).

L'hybridation moléculaire des plantes de 4^e génération avec le gène *atpA* met en évidence une zone de recombinaison située dans la région du gène *atpA* et caractérisée par un fragment EcoRV de 7 kb (Figure 3). Cette zone de recombinaison est présente chez toutes les plantes de 4^e génération que nous avons analysées, ce qui confirme la stabilisation du génome mt.

Conclusion

Des chicorées mâles-stériles ont donc été créées par fusion de protoplastes. L'origine de ce caractère est cytoplasmique comme l'ont prouvé les analyses des descendance et les hybridations moléculaires. L'état actuel de nos recherches ne nous permet pas de déterminer si le gène responsable de ce caractère est le même que celui qui a été mis en évidence chez le tournesol [2, 3] ou si un nouveau gène chimérique a été créé par recombinaison des génomes mitochondriaux.

L'acquisition de ce caractère chez cette espèce représente un gain important pour la production de lots de semences avec des taux d'hybridité optimaux.

Références

1. Alexander MP (1969). Differential staining of aborted and non-aborted pollen. *Stain Tech* 41 : 117-122.
2. Köhler RH, Horn R, Lösll A, Zetsche K (1991). Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the cotranscription of a new open reading frame with the *atpA* gene. *Mol Gen Genet* 227 : 369-376.
3. Laver HK, Reynolds SJ, Moneger F, Leaver CJ (1991). Mt genome organization and expression associated with cytoplasmic male sterility in sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant J* 1(2) : 185-193.
4. Rambaud C, Dubois J, Vasseur J (1990). Some factors related to protoplast culture and plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of Magdeburg chicory (*Cichorium intybus* L. var. Magdeburg) *Agronomie* 10 : 767-772.
5. Rambaud C, Dubois J, Vasseur J (1992). The induction of tetraploidy in Chicory (*Cichorium intybus* L. var. Magdebourg) by protoplast fusion. *Euphytica* 62 : 63-67.
6. Rambaud C, Dubois J, Vasseur J (1993). Male-sterile chicory cybrids obtained by intergeneric protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 87 : 347-352.

51

Application de la technique biolistique pour la transformation génétique du froment

F. DELPORTE, J.-M. JACQUEMIN

Centre de Recherches Agronomiques, Station d'Amélioration des Plantes, 4, rue du Bordia, B-5030 Gembloux, Belgique.

Résumé

*L'utilisation du canon à particules représente une méthode supplémentaire de transformation génétique des espèces végétales. Au sein des céréales, le système de transformation exploitant les propriétés naturelles d'*Agrobacterium tumefaciens* est inopérant. Dans le cas précis du blé, la technique dite biolistique, en offrant la possibilité de délivrer de l'ADN dans des amas cellulaires, permet de contourner la difficulté à régénérer une plante fertile au départ d'une cellule unique, pré-requis aux méthodes de transfert direct d'ADN dans des protoplastes (électroporation, traitement au polyéthylène glycol, choc osmotique ou microinjection).*

Nous appliquons cette technologie en vue de l'obtention de transformants stables de blé. A cet effet, des embryons immatures ainsi que des agrégats cellulaires d'embryons matures sont utilisés comme cibles en vue de générer des plantules par voie d'embryogenèse, embryogenèse somatique ou organogenèse.

De plus, dans le souci d'accroître l'efficacité de la méthode de transformation, nous testons l'effet de la juxtaposition d'une séquence d'ADN génomique de froment à un gène marqueur.

Le présent travail s'inscrit dans la volonté d'offrir à la sélection classique l'opportunité d'insérer un ou plusieurs gènes dans le génome de variétés existantes, de concevoir un outil supplémentaire permettant de créer des cultivars qui ne pourraient pas être obtenus par les méthodes traditionnelles de croisement.

Le succès de la méthode de transformation génétique repose sur la définition de la meilleure combinaison d'un vecteur de transformation et d'une méthode de régénération à haute fréquence. Cette combinaison est couplée à des techniques efficaces de sélection des transformants et de validation du phénomène de la transformation (Tableau I). Cette dernière repose sur des analyses moléculaires prouvant l'insertion des séquences exogènes au sein du génome nucléaire, des tests biochimiques démontrant la présence des protéines correspondantes et leur activité éventuelle, ainsi que sur la vérification de la ségrégation du caractère selon le schéma attendu.

Tableau I. Principe de la transformation génétique des végétaux.

Vecteur de transformation	Matériel régénéré
<i>A. tumefaciens</i> (spectre plante-hôtes réduit)	Protoplastes Cellules agrégats cellulaires
Transfert direct ADN nu (fréq. de transformants stables faible)	tissus organe
Électroporation PEG, cations divalents (Ca, Mg) Liposomes polycations microinjection canon à particules	

↓

Sélection des transformants

↓

Validation du phénomène de transformation

Le choix de cette combinaison idéale pour les monocotylées en général, et les céréales en particulier, reste très ardu. Le vecteur de transformation le plus communément employé, *Agrobacterium tumefaciens*, présente un spectre de plantes-hôtes qui se réduit presque exclusivement aux dicotylées. Cette bactérie du sol peut transformer génétiquement les cellules des plantes qu'elle infecte par transfert dans le génome nucléaire de celles-ci d'un fragment de son propre matériel génétique : le T-DNA. Selon l'hypothèse de Potrikus [22], le succès de l'utilisation de ce vecteur repose sur la faculté de réponse à la blessure des cellules-hôtes, inexistante chez les plantes monocotylées. Quoique l'on ait signalé la transformation du riz [23] et celle du maïs [11] par l'emploi d'*Agrobacterium tumefaciens*, ce dernier est généralement peu efficace chez les céréales.

Devant l'incapacité d'exploiter les propriétés naturelles d'*A. tumefaciens*, et suite au développement de la biologie cellulaire et des techniques de régénération de plantes, on a développé des méthodes de transfert direct d'ADN. Ces méthodes requièrent une technologie qui permette le passage de l'ADN au travers des structures cellulaires : au travers du plasmalemmme dans le cas de protoplastes, au travers du plasmalemmme et de la paroi cellulaire dans le cas de cellules, d'agrégats cellulaires ou de tissus. Cela est possible par le traitement des cellules par des voies chimiques, électriques ou physiques.

Parmi les trois céréales majeures (riz, maïs, froment) qui couvrent presque la moitié de l'alimentation mondiale, les méthodes conduisant de manière reproductible à l'obtention de plantes transgéniques sont, comme le résume le Tableau II, celles qui appliquent une méthode de transfert direct d'ADN :

- transfert direct d'ADN dans des protoplastes par la production d'un choc osmotique ou électrique dans le cas du riz, et régénération subséquente de plantules au départ des protoplastes transformés ;
- transfert direct d'ADN dans des cellules intactes dans le cas du maïs, du riz et tout récemment dans le cas du blé également, au moyen du canon à particules.

La technique dite biolistique est une méthode physique de transfert direct d'ADN qui utilise des microprojectiles métalliques enrobés d'ADN. Ceux-ci sont soumis à une grande vélocité en direction des tissus ou des cellules isolées choisis comme cible pour y délivrer l'information génétique dont ils sont porteurs. Depuis que le concept en a été décrit par Sanford [24], cette méthode a démontré son efficacité pour réaliser l'introduction d'ADN dans un matériel biologique très varié appartenant tant aux procaryotes qu'aux eucaryotes, qu'il s'agisse de cellules bactériennes [25], de levures [2], de champignons [6], de cellules animales [16, 30, 3] ou végétales [4]. De même, le type d'explant manipulé peut être très diversifié : cellule unique, agrégat cellulaire indifférencié ou tissu organisé, organe.

Dans le domaine de la transformation génétique des végétaux, depuis le premier rapport décrivant l'observation de l'expression transitoire d'informations génétiques étrangères dans les cellules épidermiques d'oignon [17], l'intérêt du bombardement de particules est clairement établi pour délivrer l'ADN dans des espèces végétales d'intérêt agronomique récalcitrantes aux techniques classiques. Dans le cas précis du blé, l'avantage réside dans la possibilité d'introduire l'ADN dans des amas cellulaires, nous

Tableau II. Résumé des méthodes permettant l'obtention de manière reproductible de céréales transgéniques.

Vecteur de transformation	Riz	Maïs	Blé
A. tumefaciens	[23]	[11]	
Transfert direct dans des protoplastes			
Choc osmotique (PEG)	[7] [13]		
Choc électrique	[26-28, 31]		
Transfert direct dans des cellules au moyen du canon à particules			
Suspensions cellulaires		[9] [10]	
Cals embryogènes			[29]
Scutellum d'embryons immatures	[5]		

permettant de contourner la difficulté à régénérer une plante fertile au départ d'une cellule unique. Vasil [29] décrit pour la première fois l'obtention de blés transgéniques en faisant appel à cette méthode : l'auteur utilise comme cible des cals embryogéniques desquels il induit la formation, et ensuite la germination, d'embryons somatiques.

Matériel et méthode

La technique biolistique

Dans l'appareillage qui nous permet de contrôler les caractéristiques balistiques de cette méthode, l'accélération des projectiles est produite par la détente d'un gaz (hélium).

Le dispositif est muni (Figure 1) :

- d'une chambre à dépression ;
- dans laquelle est introduit un tube d'accélération, connecté à une bonbonne d'alimentation en hélium comprimé ;
- celui-ci déclenche, pour une valeur déterminée de la pression, la rupture d'une membrane (disque de rupture) ;
- la vitesse des particules est acquise suite à la propulsion d'un support (macroporteur) ;
- le macroporteur portant à sa face inférieure les particules métalliques sur lesquelles est précipité l'ADN est brutalement arrêté dans sa course par une plaque d'arrêt, tandis que les microprojectiles poursuivent leur trajectoire avec une vitesse qui est déterminée par : leur masse, l'impulsion initiale, elle-même fonction de la pression de rupture, et enfin, les positions relatives du macroporteur et de la plaque d'arrêt par rapport à l'échantillon.

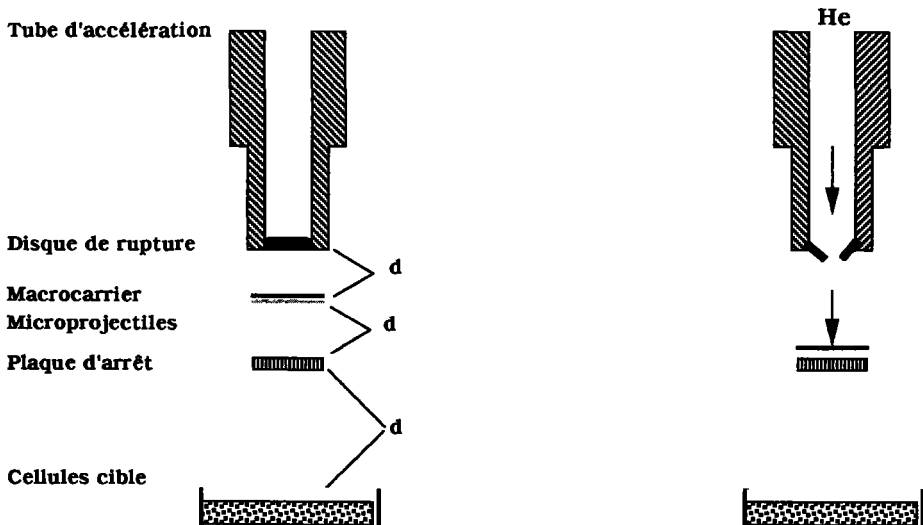


Figure 1. Schéma du canon à particules.

Construction plasmidique

La construction utilisée porte, comme gène marqueur sélectionnable, le gène *bar*, isolé en premier lieu à partir du champignon *Streptomyces hygroscopicus* [8], codant pour la phosphinotricine acétyl transférase (PAT), inséré dans le plasmide pUC (Figure 2). L'enzyme PAT catalyse la réaction de détoxification par acétylation de la phosphinotricine (PPT), matière active constitutive de l'herbicide Basta. A ce marqueur nous avons associé le gène bactérien *gus* [15], codant pour l'enzyme β -glucuronidase, comme gène rapporteur.

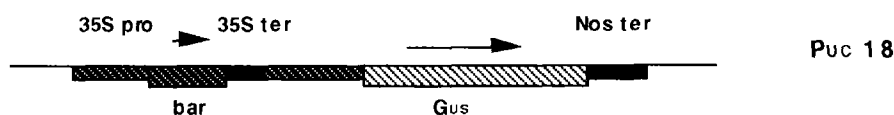


Figure 2. Construction plasmidique 1.

Méthodologie de travail

Des embryons zygotiques immatures et des agrégats cellulaires d'embryons matures sont utilisés comme tissus-cibles en vue de générer des plantules par voie d'embryogenèse, d'embryogenèse somatique ou d'organogenèse.

L'utilisation du canon à particule est couplée à l'un de ces trois modes de régénération (Tableau III), dans le souci de définir la meilleure combinaison, c'est-à-dire celle qui conduira à l'obtention du plus grand nombre de candidats transformés, tout en induisant le moins de mutations. On sait en effet que les processus de dédifférenciation et de régénération occasionnent des dommages génétiques. Ce dernier aspect sera contrôlé par le dénombrement chromosomique dans les cellules méristématiques des extrémités de jeunes racines bloquées en métaphase par du α -bromonaphtalène et colorées au réactif de Schiff et au carmin acétique [14].

Selon l'option de la régénération par embryogenèse somatique, des agrégats cellulaires d'embryons matures sont obtenus par extrusion de ces derniers au travers d'un fin tamis en nylon en conditions aseptiques. Les explants sont mis en culture pour induire la formation d'embryons somatiques en présence d'auxine et leur germination

Tableau III. Schéma de la méthodologie de travail.

Vecteur de transformation	Méthode de régénération
Canon à particules [24]	Embryogenèse Embryogenèse somatique Organogenèse
↓	
Taux des transformants	
↓	
Stabilité génotypique	

en présence de cytokinines. Ces phases de culture successives sont effectuées sous la pression de sélection du sel d'ammonium de la PPT, dont la concentration est graduellement accrue de 1 à 5, 10, 20 et finalement 40 mg/l.

Dans le cas de la régénération par embryogenèse et organogenèse, les tissus méristématiques d'embryons immatures et les agrégats cellulaires d'embryons matures respectivement sont traités pour la transformation, puis mis en culture en présence de cytokinines pour la régénération immédiate d'une jeune plantule, sans le passage par une phase cal indifférencié. Les plantules sont initiées sur un milieu de culture dépourvu de toute pression de sélection pendant 5 à 20 jours, cette étape correspondant à une période de remise en condition de division cellulaire comme suggéré par Christou [5]. La culture de ces tissus est ensuite effectuée sous la pression de sélection de la même matière active dont la concentration est graduellement accrue de 1 à 5 et 10 mg/l.

Les plantules initiées en boîte de Pétri sont transférées en tube pendant la phase de sélection, repiquées ensuite en terrine de tourbe pour leur acclimatation, et enfin transplantées en pot pour la croissance.

Le Tableau IV décrit les conditions de culture utilisées pour chacun des procédés de régénération.

De plus, dans le souci d'accroître l'efficacité de la méthode de transformation, nous testons l'effet de la juxtaposition d'une séquence d'ADN génomique de blé à un gène marqueur. Dans ce dernier cas, la construction utilisée porte le gène marqueur sélectionnable *nptII* codant pour la néomycine phosphotransférase (NPT) jouxtant ou non des séquences d'ADN génomique de blé (W1, W5, W10, W11) [1]. Celles-ci sont fonctionnelles en tant qu'origines de réplication chez la levure et sont généralement des séquences hautement répétées dans le génome du froment. Elles pourraient accroître l'efficacité de la transformation, soit par le maintien de la construction dans la cellule-hôte, soit en favorisant l'intégration des séquences adjacentes dans le génome-hôte par recombinaison homologue.

Tableau IV. Tableau récapitulatif des conditions de culture et pressions de sélection appliquées pour chacun des procédés de régénération.

Procédés de régénération			
	Embryogenèse somatique	Embryogenèse	Organogenèse
Tissu d'origine	embryon mature	embryon immature	embryon mature
Explant traité	agrégats cellulaires	embryon	agrégats cellulaires
Millieux et hormones de croissance	induction : (1) 2,4 D 10^{-5} germination : (2) IAA 10^{-6} Zeatine 10^{-6}	régénération : (1) IAA 10^{-6}	régénération : (2) IAA 10^{-6} Zeatine 10^{-6}
Pression de sélection PPT-glufosinate NH_4	40 mg/l	5-10 mg/l	5-10 mg/l

(1) : [21]

(2) : [20]

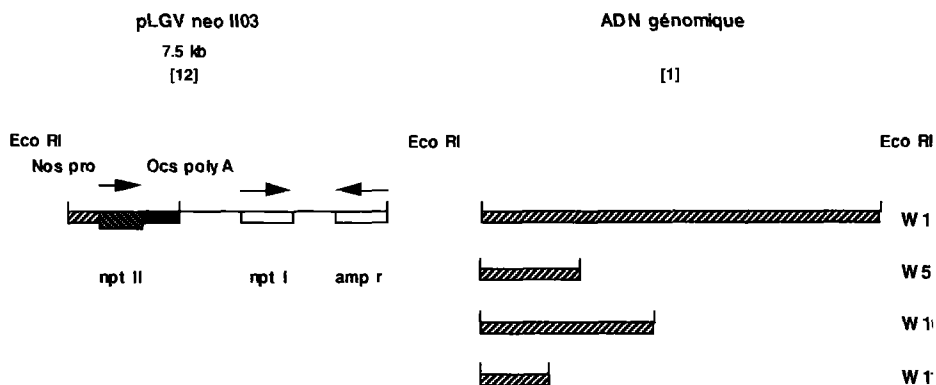


Figure 3. Construction plasmidique 2.

Des agrégats cellulaires d'embryons matures bombardés avec cette construction sont l'objet d'une pression de sélection en présence de l'antibiotique kanamycine à des concentrations graduellement accrues de 50 à 100 et 150 mg/l.

Résultats

Selon la régénération par embryogenèse somatique, des plantes ont été obtenues lors des essais préliminaires d'induction et de germination d'embryons somatiques, en l'absence de toute manipulation génétique et de sélection : 0,7 % des explants ont conduit à une plante enracinée fertile. Les graines récoltées seront mises à germer afin d'effectuer le comptage chromosomique. Après le traitement de transformation, nous avons obtenu de nombreux cals résistant à la pression de sélection finale de 40 mg/l de PPT depuis plusieurs mois. Cependant, aucune plantule n'a encore pu être générée au départ de ces cals. L'essai est à reproduire en réduisant la période de sélection afin de préserver la compétence à la régénération de ces tissus.

Dans le cas de la régénération par embryogenèse, 118 plantes enracinées ont été obtenues au départ de 2 757 embryons immatures bombardés et sélectionnés : 4,2 % des embryons ont donné naissance à une plantule qui a résisté aux différentes phases de sélection, d'enracinement et d'acclimatation. Ce taux est supérieur à celui obtenu dans le cas des témoins non bombardés mais soumis à la même pression de sélection.

L'activité enzymatique de la β -glucuronidase a été observée de manière transitoire dans des cals produits selon le mode de régénération par embryogenèse somatique et dans les feuilles de plantes générées par embryogenèse, 15 jours après le traitement de transformation.

Selon la régénération par organogenèse, 11 % des explants conduisent à une plante enracinée. Deux plantes résistantes à la pression de sélection ont été obtenues par ce procédé.

Discussion

Il est à noter que la nature du système de régénération influence l'ampleur des phénomènes de variation génotypique et détermine également le degré de chimère qui sera observé dans les candidats à la transformation.

Le procédé de régénération par embryogenèse somatique donne l'avantage d'espérer observer la croissance préférentielle des cellules modifiées avant l'induction de l'embryogenèse, et ainsi, la régénération de plantules au départ d'un matériel non chimérique. Cependant, la durée de culture qu'il suppose est relativement longue et peut produire un effet négatif sur la compétence à la régénération et la stabilité génotypique. De plus, on a montré dans d'autres systèmes que toutes les plantes générées au départ de tissus embryogéniques sélectionnés ne sont pas nécessairement transformées : il semble que, lorsque des cellules transformées sont capables de détoxifier l'agent de sélection, les tissus adjacents non transformés bénéficiant de cette capacité survivent et donnent naissance également à une plantule. Pour la même raison, on n'est pas à l'abri de générer des plantes chimériques [5].

Selon les méthodologies de travail impliquant la régénération par embryogenèse et par organogenèse, on peut s'attendre à un degré de chimérisme élevé. On sait par les travaux de Christou et McCabbe chez le soja [19] et de McCabbé chez le coton [18] qu'il est possible d'obtenir des plantes transgéniques par voie d'organogenèse, suite au bombardement de tissus méristématiques. Un très grand nombre de plantes sont chimériques, néanmoins quelques plantes clonales ont été obtenues. La fréquence de transformation de la lignée germinale de ces plantes chimériques est relativement faible, la transmission du caractère se fait de manière non mendélienne de RO à R1, cependant, l'analyse de R2 indique une hérédité conforme aux lois de Mendel [4].

Conclusion

L'utilisation du canon à particules est une méthode physique de transfert direct d'ADN qui représente une approche supplémentaire pour réaliser la transformation génétique d'espèces végétales d'intérêt agronomique récalcitrantes aux autres techniques. Le type d'explant manipulé peut être très diversifié.

Trois méthodes de régénération sont couplées à cette méthode afin de définir la combinaison qui conduise à l'obtention du plus grand nombre de transformants tout en réduisant au minimum les problèmes de variations génétiques inhérents aux conditions de culture.

La vérification de l'intégration des séquences exogènes dans le génome nucléaire par la méthode Southern et l'analyse de l'expression du caractère ainsi que de son hérédité mendélienne seront suivies du comptage chromosomique dans les cellules méristématiques racinaires afin d'apprécier l'impact des différentes méthodes de régénération sur la stabilité chromosomique.

Références

1. André D, Jacquemin JM, Masson P (1983). Isolation and characterization of DNA sequences from *Triticum aestivum* which function as origin of replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Cell Rep* 2 : 175-178.
2. Armaleo D, Ye Gn, Klein TM, Shark KB, Sanford JC, Johnston SA (1990). Biolistic nuclear transformation of *Sacharomyces cerevisiae* and other fungi. *Curr Genet* 17 : 97-103.
3. Baldarelli RM, Lengyl JA (1990). Transient expression of DNA after ballistic introduction into *Drosophila* embryos. *Nucleic Acid Res* 18 : 5903-5904.
4. Christou P (1992). Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *Plant J* 2(3) : 275-281.
5. Christou P, Ford TL, Kofron M (1991). Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature Zygotic embryos. *BioTechnology* 9 : 957-962.
6. Cummings DJ, Domenico JM, Sandford JC (1990). Mitochondrial DNA from *Podospora anserina* : transformation to senescence via projectile injection of plasmids. *Mol Biol Aging* 123 : 91-101.
7. Datta SK, Peterhans A, Datta K, Potrykus I (1990). Genetically engineered fertile indica rice recovered from protoplasts. *BioTechnology* 8 : 736-740.
8. De Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gossele V, Movva NR, Thompson C, Van Montagu M, Leemans J (1987). Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J* 6 : 2515-2518.
9. Fromm ME, Morrish F, Armstrong C, Williams R, Thomas J, Klein TM (1990). Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *BioTechnology* 8 : 833-839.
10. Gordon-Kamm WJ, Spencer TM, Mangano ML, Chambers SA, Adams TR, Daines RJ, Start WG, O'Brien JV, Chambers SA, Adams WR, Willets NG, Rice TB, Mackey CJ, Kruger RW, Kausch A.P, Lemaux PG (1990). Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2 : 603-618.
11. Gould J, Devey M, Hasegawa O, Ulian EC, Peterson G, Smith RH (1991). Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiol* 95 : 426-434.
12. Hain R, Stabel P, Czernilofsky AP, Steinbib HH, Herrera-Estrella L, Schell J (1985). Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimaeric gene by plant protoplasts. *Mol Gen Genet* 199 : 161-168.
13. Hayashimoto A, Li Z, Murai N (1990). A PEG-mediated transformation system for production of fertile transgenic rice plants. *Plant Physiol* 93 : 857-863.
14. Jahier J, Chèvre F, Delourme R, Eber F, Tanguy AM (1992). In : Jahier J, ed. *Techniques de cytogénétique végétale*. NRA Éditions.
15. Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. (1987). GUS fusion : β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6 : 3901-3907.
16. Johnston SA, Riedy M, De Vit MJ, Sanford JC, McElligott S, Williams RS. (1991). Biolistic transformation of animal tissue. *In Vitro Cell Dev Biol* 27 : 11-14.
17. Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC (1987). High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327 : 70-73.
18. McCabe DE, Martinell BJ (1993). Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. *BioTechnology* 11 : 596-598.
19. McCabe DE, Swain WF, Martinell BJ, Christou P (1988). Stable transformation of soyabean (*Glycin max*) by particle acceleration. *BioTechnology* 6 : 923-926.
20. Ozias-Akins P, Vasil IK (1982). Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat) : evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma* 110 : 95-105.

21. Picard E, De Buyser J (1977). High production of embryoids in anther culture of pollen derived homozygous spring wheats. *Ann Amelior Plantes* 27 (4) 483-488.
22. Potrykus I. (1990). Gene transfer to cereals : an assessment. *BioTechnology* 8 : 535-542.
23. Raineri DM, Bottino P, Gordon MP, Nester EW (1990). *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). *BioTechnology* 8 : 33-38.
24. Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J Part Sci Tech* 6 : 559-563.
25. Shark KB, Smith FD, Harpending PR, Rasmussen JL, Sanford JC (1991). Biolistic transportation of a prokaryote *Bacillus megaterium*. *Appl Environ Microbiol* 57 : 480-485.
26. Shimamoto K, Terada R, Izawa T, Fujimoto H (1989). Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338 : 274-276.
27. Tada Y, Sakamoto M, Fujimura T (1990). Efficient gene introduction into rice by electroporation and analysis of transgenic plants : use of electroporation buffer lacking chloride ions. *Theor Appl Genet* 80 : 475-480.
28. Toriyama K, Arimoto Y, Uchimiya H, Hinata K (1988). Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *BioTechnology* 6 : 1072-1074.
29. Vasil V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK (1992). Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *BioTechnology* 10 : 667-674.
30. Zelenin AV, Alimov AA, Barmintzev VA, Beniumov AO, Zelenina IA, Krasnov AM, Kolesnikov VA (1991). The delivery of foreign genes into fertilized fish eggs using high velocity microprojectiles. *FEBS Lett* 287 : 118-120.
31. Zhang W, Wu R (1988). Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. *Theor Appl Genet* 76 : 835-840.

52

Des plants de vignes transgéniques obtenus par embryogenèse somatique

M.-C. MAURO, S. TOUTAIN, A. DELOIRE

Moët et Chandon, 20, avenue de Champagne, BP 140, 51333 Epernay, France.

La vigne est une des cultures fruitières la plus largement cultivée dans le monde, mais aussi l'une des cultures la plus chimiquement traitée.

Dans le cas du virus du court-noué (*grapevine fanleaf virus* (GFLV)) par exemple, les méthodes utilisées actuellement, comme la sélection sanitaire, la désinfection des sols ou la thermothérapie, ont parfois une efficacité limitée. Dans tous les cas, la recontamination ne peut être évitée.

De plus, les produits nématocides utilisés pour lutter contre le nématode vecteur du virus présentent des risques importants de pollution des eaux souterraines, et leur utilisation est déjà interdite dans plusieurs pays viticoles.

Plusieurs voies de recherche sont actuellement à l'étude pour lutter contre cette maladie virale. Parmi les plus récentes : la prémunition et l'introduction de gènes de résistance dans le génome de la vigne. C'est cette dernière voie biotechnologique que le laboratoire de Moët & Chandon a choisi de développer.

Des publications récentes rapportent la possibilité de transformer génétiquement des cellules, des embryons ou des bourgeons de vigne [1, 3, 6], plus rarement d'obtenir la régénération des plantes transformées [7, 8].

Dans cet article, nous décrivons le système de régénération de la vigne qui nous a permis de mettre au point une technique de transformation génétique reproductible et applicable à deux porte-greffes, le 41B et le SO4, ainsi qu'à un cépage, le Chardonnay. L'obtention de plants de vigne transformés avec les gènes GUS et NPTII pour ces trois génotypes est ici mise en évidence.

Résultats

La technique d'embryogenèse somatique

La technique d'embryogenèse somatique développée par le laboratoire de Moët & Chandon a été améliorée grâce à la collaboration de plusieurs laboratoires de recherche publique dans le cadre de programmes français soutenus par le ministère de la Recherche et de l'Espace.

Cette technique a d'abord été mise au point pour le porte-greffes 41B (*Vitis vinifera* × *Vitis berlandieri*). Des suspensions cellulaires embryogènes de ce génotype sont entretenues en milieu liquide depuis cinq ans sans perte du pouvoir embryogène de la culture. Ces cellules produisent en moyenne cent embryons somatiques par µl de cellules embryogènes.

Cependant, la qualité des embryons peut varier. Elle serait surtout liée à l'excrétion dans le milieu de culture par les embryons de protéines inhibitrices à leur développement [5]. D'où l'idée d'éliminer ces protéines en renouvelant chaque jour le milieu de culture des embryons [4]. Cela permet d'obtenir un développement en plants des embryons avec un taux de 70 %.

Ce protocole a été appliqué à différents clones de 41B avec le même taux de réussite.

Pour un autre porte-greffes, le SO4, et un cépage, le Chardonnay, le nombre d'embryons somatiques obtenus par µl de cellules est inférieur à celui du 41B (60 embryons/µl de cellules). Cependant, ce nombre d'embryons et leur bon développement, ensuite, en plantules reste suffisant pour développer une technique de transformation génétique.

La transformation génétique par l'intermédiaire d'*Agrobacterium tumefaciens*

• La coculture et la sélection des cellules transformées

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisée pour la mise au point de la technique de transformation nous a été fournie par L. Willmitzer [10]. Le plasmide vecteur renferme le gène GUS sous le contrôle d'un promoteur 35S et le gène NPTII sous le contrôle d'un promoteur NOS. Le gène marqueur GUS permet, deux à trois jours après la coculture des cellules embryogènes avec les bactéries, de visualiser le pourcentage de cellules transformées. Pour les trois génotypes, 41B, SO4 et Chardonnay, des pourcentages de cellules transformées de l'ordre de 70 % à 80 % peuvent être obtenus. En moyenne, ce pourcentage est de 80 % pour le 41B, 45 % pour le SO4, et 22 % pour le Chardonnay. Deux mois après la coculture, ce pourcentage se stabilise autour de 40 % à 50 %. Ce taux peut être progressivement augmenté par l'ajout de paromomycine dans les milieux de culture. Les cellules embryogènes de vigne sont très sensibles à cet antibiotique, et une dose de 5 mg/l est suffisante pour inhiber la multiplication des cellules non transformées. Nous possédons maintenant une culture embryogène de 41B dont 90 % des cellules sont transformées. Cette culture se multiplie depuis un an de façon comparable à une culture témoin.

• La régénération d'embryons somatiques et de plants

La technique classique de régénération d'embryons et de plants est appliquée aux cellules transformées. L'antibiotique à la concentration de 5 mg/l est ajouté le premier jour de la culture. Alors que des embryons témoin produisent les premières plantules après cinq semaines de culture, pour le matériel transformé, il faudra deux semaines de plus, soit sept semaines pour obtenir les premières plantes.

Le nombre d'embryons obtenus est également inférieur. Pour cent embryons régénérés par μl de cellules témoin, 52 embryons en moyenne seront obtenus à partir d'un microlitre de cellules transformées de 41B. En revanche, le pourcentage d'embryons se développant en plantes reste le même pour le matériel témoin et pour le matériel transformé, soit 70 %.

• *L'analyse des plants transformés*

Des tests GUS ainsi que des enracinements de microboutures sur des milieux supplémentés en kanamycine ont été réalisés.

Pour le 41B, soixante-neuf plants issus de trois expériences différentes donnent respectivement au test GUS, 87 %, 65 % et 57 % de plants positifs. Des analyses d'ADN par *Southern* réalisées sur une dizaine de plants confirment la présence de ce gène (Figure 1).

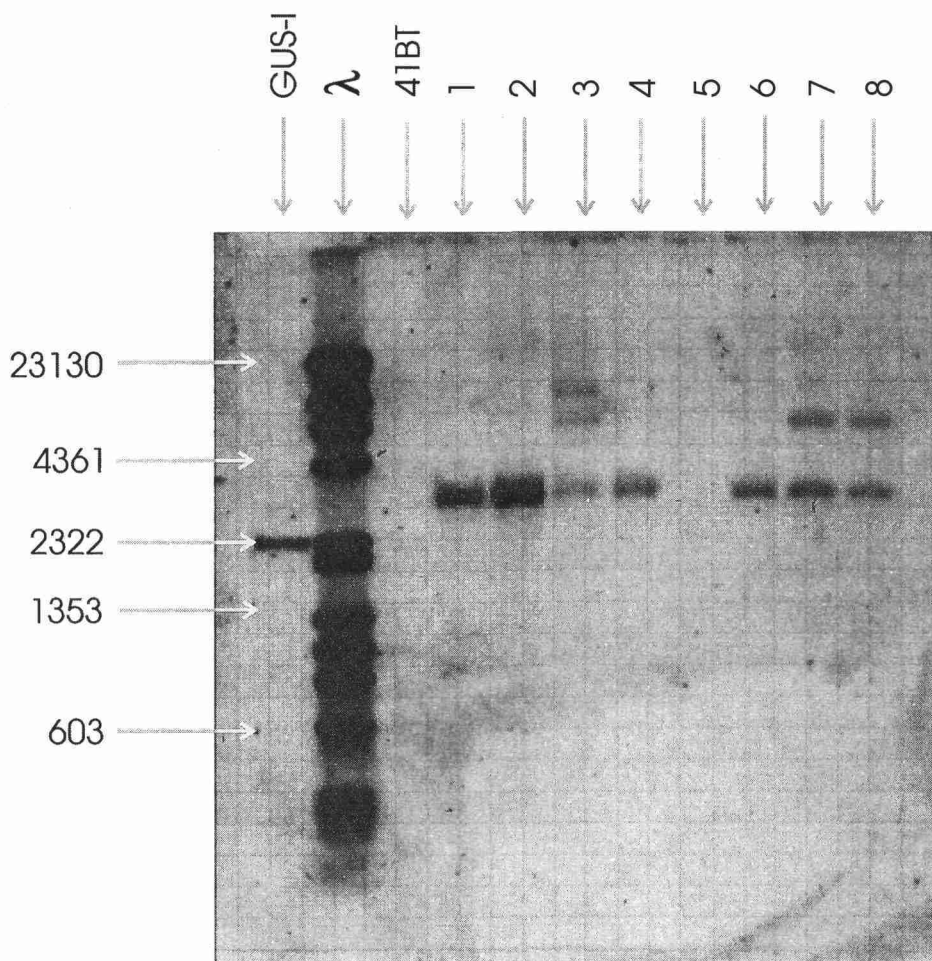


Figure 1. Autoradiographie d'une hybridation *Southern* d'ADN extrait de plants de 41B.

GUS-I : fragment d'ADN correspondant à la sonde utilisée pour cette hybridation.

41BT : ADN de plants témoins.

1 à 8 : ADN de plants transformés.

Les nombres de gauche indiquent la taille des fragments d'ADN en paires de bases (pb).

L'enracinement de microboutures sur des milieux supplémentés en kanamycine (10 mg/l, concentration inhibant tout enracinement du témoin) a été réalisé pour 38 plants positifs au test GUS. 90 % sont résistants à la kanamycine et émettent, après 10 à 12 jours de culture, des racines à la base des microboutures.

Pour le Chardonnay, sur 31 plants testés, 22 (71 %) présentent une activité du gène GUS. En ce qui concerne le SO4, les premiers plants obtenus jusqu'alors présentent également une coloration bleue en présence de X.Gluc.

Conclusion

La technique de transformation mise au point pour le 41B peut être appliquée au SO4 et au Chardonnay. Dans ces trois cas, des suspensions embryogènes de cellules transformées sont obtenues et se multiplient. Les performances embryogènes des trois génotypes sont différentes, mais suffisantes pour obtenir de façon reproductible des embryons somatiques et des plants exprimant les nouveaux gènes intégrés.

La première application agronomique de ces techniques est l'introduction du gène de la capside du GFLV isolé par Serghini *et al.* [9] dans le génome du 41B. L'INRA de Colmar et l'IBMP de Strasbourg participent à ce programme soutenu par l'ANVAR. 300 plants environ ont été régénérés dont 86 % résistent à la kanamycine. D'autres analyses se poursuivent ainsi que des essais en serre, afin de confirmer le meilleur comportement de tels plants en cas d'attaque par le virus.

Références

1. Baribault TJ, Skene KGM, Steele Scott N (1989). Genetic transformation of grapevine cells. *Plant Cell Rep* 8 : 137-140.
2. Baribault TJ, Skene KGM, Cain PA, Steele Scott N (1990). *J Exp Botany*, 41 : 105-111.
3. Berres R, Otten L, Tinland B, Malgarini-Clog E, Walter B (1992). Transformation of *Vitis* tissue by different strains of *Agrobacterium tumefaciens* containing the T.6b gene. *Plant Cell Rep* 11 : 192-195.
4. Coutos-Thevenot P, Goebel-Tourand I, Mauro MC, Jouanneau JP, Boulay M, Deloire A, Guern J (1992). Somatic embryogenesis from grapevine cells. I. Improvement of embryo development by changes in culture conditions. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture* 29 : 125-133.
5. Coutos-Thevenot P, Maes O, Jouenne T, Mauro MC, Boulay M, Deloire A, Guern J (1992). Extracellular protein patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and non embryogenic situations. *Plant Sci*, 86 : 137-145.
6. Guellec V, Netzer MH, Robin O, David C, Mauro MC, Deloire A, Tempe J (1990). *Agrobacterium*-mediated transformation of grapevine embryogenic calli. VIIth International Congress on plant tissue and cell culture, Amsterdam, June 1990.
7. Mauro MC, Toutain S, Deloire A (1992). Genetic transformation of 41B grapevine rootstock through *Agrobacterium tumefaciens*. XIIIth Eucarpia Congress, July 6-11th, Angers.
8. Mullins MG, Archie Tang FC, Facciotti D (1990). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevines. Transgenic plants of *Vitis rupestris* SCHEELLE and buds of *Vitis vinifera* L. *Biotechnology*, vol. 8 : 1041-1045.
9. Serghini MA, Fuchs M, Pinck M, Reinbolt J, Walter B, Pinck L (1990). RNA2 of grapevine

fanleaf virus : sequence analysis and coat protein cistron location. *J Gen Virol* 71 : 1433-1441.

10. Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M (1990). Construction of an intron-containing marker gene : splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* 220 : 245-250.

53

Expériences de manipulations génétiques de l'orge par l'utilisation du bombardement biolistique

J. DE LAFONTEYNE, M. SORMANN, B. VAN DE COTTE

*Laboratoire de Génétique Moléculaire, Faculté d'Agronomie et de Biologie Appliquée
Université de Gand, Coupure L, 653 Gand, B-9000, Belgique.*

Résumé

Deux méthodes sont présentées qui permettent la transformation de céréales. Dans la première méthode, des fleurs, avant la fertilisation, sont imbibées d'un mélange de cultures d'Agrobacterium induits, portant l'un, sur son ADN-T, un gène de transposase Ac sans bordures de transposon et l'autre, sur son ADN-T, le gène à introduire, flanqué par les bordures du transposon Ac. Dans la seconde méthode, des microcals, provenant de microspores, sont bombardés avec un mélange de gènes de transposase Ac sans bordures de transposon et le(s) gène(s) à introduire, flanqués par les bordures du transposon Ac.

En 1982, le président de l'IBA (*International Breeders Association*), M. L. Matton, nous a posé la question de savoir s'il n'y avait pas moyen de transformer les céréales, dans le but d'augmenter leur résistance aux maladies.

A cette époque, le rêve de manipuler le génome des plantes venait d'être réalisé chez le tabac.

Concernant les céréales, on ne trouvait, dans la littérature que quelques articles décrivant des techniques susceptibles de faciliter la transformation des céréales et notamment, des techniques permettant la régénération de céréales à partir de cellules isolées : la culture de microspores et d'ovules.

Notre premier but était de mettre au point la régénération de l'orge à partir de microspores, par la technique de culture d'anthères. Les techniques décrites en 1982 pouvaient en général être utilisées avec un nombre limité de lignées d'orge de printemps et il fallait donc améliorer cette méthode afin de permettre la régénération de toutes les lignées, aussi bien d'orge de printemps que d'orge d'hiver. Cette mise au point nous a pris presque dix ans, mais on est maintenant capable de régénérer la majorité des orges par culture de microspores.

Une fois que la culture d'anthères commençait à donner des plantes vertes et fertiles, vers les années 1985, nous avons abordé le problème de la transformation génétique des céréales.

Malheureusement, à part la micro-injection, nous n'avions pas alors à notre disposition d'autres méthodes de manipulation génétique qui pouvaient être pratiquées sur microspores directement.

Entre-temps, la transformation par *Agrobacterium* était déjà bien établie. Cette technique ne pouvait pas être appliquée aux monocotylédones, à part quelques exceptions, qui, d'ailleurs, se sont avérées difficilement reproductibles.

Quelques observations faites par l'équipe de B. Hohn à Bâle et de R. Flavell à Cambridge [1, 4] permettaient d'affirmer qu'*Agrobacterium* était capable de délivrer son ADN-T dans des cellules de maïs et de blé, et que cet ADN-T était dirigé vers le noyau, puisque le virus à ADN, WDV (*wheat dwarf virus*), se multipliait dans des plantules de blé infectées avec une bactérie *Agrobacterium*, portant une copie du génome viral sur son ADN-T.

Comme les expériences de transformation de céréales avec *Agrobacterium* n'avaient jamais donné de résultats concluants, nous avons émis l'hypothèse que c'était le mécanisme moléculaire de l'intégration de l'ADN-T d'*Agrobacterium* qui ne fonctionnait pas bien dans les monocotylédones, pour une raison inconnue.

Dès lors nous avons essayé de combiner la capacité d'*Agrobacterium* de transférer son ADN-T dans le noyau des cellules de céréales, avec la capacité d'un transposon comme *Ac* (*Activator*) de se transposer d'une section d'ADN à une autre, c'est-à-dire à s'exciser et à s'intégrer ailleurs. Le transposon *Ac* a été isolé et caractérisé en 1984 par l'équipe de N. Fedoroff à New York et de P. Starlinger à Cologne [2, 7].

Des expériences réalisées à base de cette méthode ont donné des résultats positifs, mais ils nous ont montré en plus une technique à suivre pour la transformation génétique des microspores de céréales.

La découverte d'un système pour accélérer des particules métalliques couvertes d'ADN (bombardement biolistique), par Klein *et al.*[5], permet un transfert d'ADN indépendant d'*Agrobacterium*, en même temps que le transfert dans un grand nombre de cellules.

Une combinaison du bombardement biolistique et du système d'intégration de transposons, utilisée sur microspores, promet beaucoup pour la transformation de monocotylédones.

Expériences utilisant le transfert d'ADN par *Agrobacterium* et l'intégration par la transposase *Ac*

L'infection par *Agrobacterium* est réalisée par micro-injection dans le méristème apical de germes, comme décrit par Grimsley *et al.* [4] ou par injection de bactéries dans les

fleurs, quelques jours avant la fertilisation. Les bactéries sont induites pour le transfert par culture en milieu minimum contenant de l'acétosyringone. Sur l'ADN-T se trouvent le gène de transposase et le gène à transférer. Nous avons utilisé le clone *Ac9Wx*.

Dans les constructions finales, le gène de transposase n'est pas encadré par les bordures du transposon, tandis que le gène à transférer l'est. En d'autres termes, nous utilisons pour l'intégration un système à deux composantes : un transposon chimérique, dans lequel le gène de transposase a été remplacé par le gène à introduire, et un gène de transposase sans bordures de transposon. Le gène de transposase peut se trouver sur l'ADN-T d'un *Agrobacterium*, tandis que le transposon chimérique peut se trouver sur l'ADN-T d'un autre *Agrobacterium*. Dans ce dernier cas, on utilise un mélange des deux *Agrobacterium* pour faire la transformation et les bactéries non-mélangées peuvent servir de contrôle.

Dans les premières expériences, nous avons testé l'expression du gène *uidA* d'*Escherichia coli*, dans une cassette d'expression p-35S de CAMV (*Cauliflower mosaic virus*) et pA-*nos* (GUS, reçu de R. Jefferson), 7 jours après l'infection, avec un mélange d'*Agrobacterium* (A) portant le transposon *Ac* complet, et d'*Agrobacterium* (B) portant un transposon chimérique, contenant le gène GUS.

Dans environ 5 % à 7 % des germes injectés nous avons trouvé une activité β -glucuronidase en utilisant le substrat X-gluc (bromo-chloro-indolyl- β -D-glucuronide). Cette activité se montrait dans les cellules, aussi bien par analyse en microscopie fond-noir, qu'en microscopie électronique. Une analyse dans la génération suivante montrait un nombre de plantes (0,5 %) avec des expressions de β -glucuronidase localisées, sous forme de secteurs, dans lesquels nous avons pu démontrer l'activité enzymatique intracellulaire en microscopie fond-noir et électronique.

En 1990 nous avons infecté les fleurs d'un grand nombre de lignées de blé et des dihaploïdes d'orge, obtenues par culture d'anthers, avec un mélange d'*Agrobacterium* (A) contenant le gène de transposase sous contrôle de son propre promoteur (TPNptpn), le promoteur 35S du virus ADN CAMV (*cauliflower mosaic virus*) (TPNp35S) ou le promoteur pTR1' de l'ADN-T d'*Agrobacterium* du type mannopine (TPNpTR), et d'*Agrobacterium* (B) contenant un transposon chimérique, constitué soit du gène GUS, soit du gène *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* (reçu de *Plant Genetic Systems*) dans une cassette d'expression p-TR, pA-gène-7 (BAR).

Les semences ont été récoltées et semées en 1991. Les plantules F1 traitées avec le gène GUS en F0 ont été analysées avec le substrat X-gluc. L'expression de GUS se manifeste surtout autour du système vasculaire du coléoptile (contraste bleu/blanc), mais aussi dans les feuilles (après décoloration). Les plantes F1 traitées avec le gène BAR ont été arrosées trois fois avec l'herbicide Basta (Hoechst) (1/2 dose, 1 dose et 2 doses) et la semence des plantes survivantes a été semée en 1992.

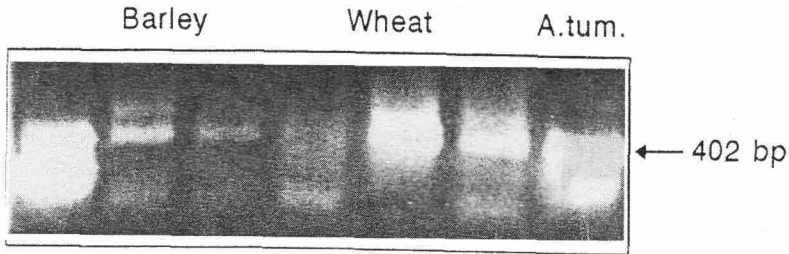
L'ADN des feuilles de plantes positives a été analysé plus en détail par PCR (*polymerase chain reaction*) et par hybridation moléculaire du type *Southern*.

Dans la majorité des plantes positives pour GUS ou BAR, un fragment correspondant au gène utilisé pour la transformation peut être amplifié en utilisant des amorces spécifiques pour *uidA* ou *bar* et nous avons pu montrer que les fragments générés après digestion par des enzymes de restriction, à partir du gène d'origine et du gène amplifié par PCR des orges transformés, sont identiques. Une analyse pour le gène *bar* est montrée dans la Figure 1.

L'hybridation moléculaire *Southern* montre que dans le cas de plantes résistantes au Basta, l'ADN des feuilles contient les gènes *bar* et *nptII* (deuxième gène de sélection).

Screening of F2 plants:

A.PCR



B.Digest of PCR fragments

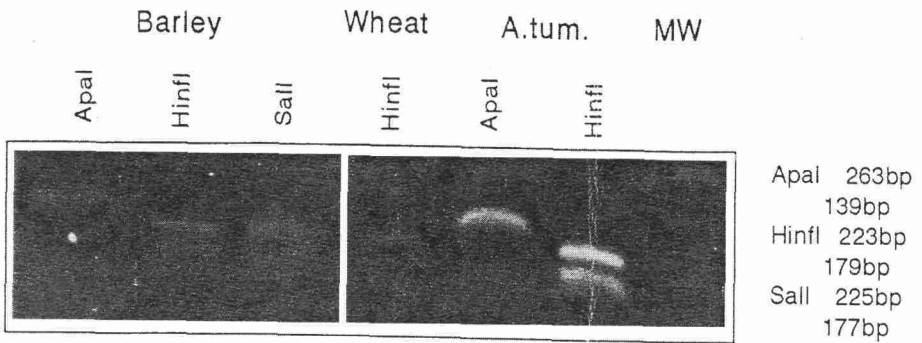


Figure 1. Analyse par PCR du gène *bar* dans l'ADN de plantes résistantes au Basta et dans l'ADN de l'*Agrobacterium* utilisé pour la transformation de céréales par injection des fleurs. A. PCR. B. Digestion des fragments obtenus par PCR.

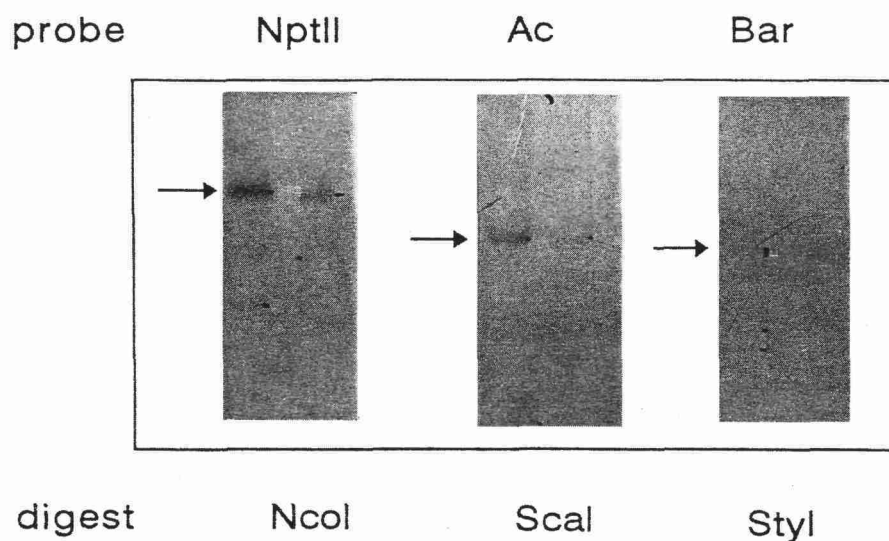


Figure 2. Analyse par hybridation *Southern* des gènes introduits dans les orges résistant au Basta.

Longueur des fragments:

Gène	Sonde	Orge	<i>A. tumef.</i>
<i>nptII</i>	1, 2 Kbp	8 Kbp	9, 5 Kbp
bordures <i>Ac</i>	1, 8 Kbp	4, 5 Kbp	7, 3 Kbp
<i>bar</i>	1, 4 Kbp	4, 5 Kbp	4, 8 Kbp

Des séquences bordures d'Ac et la longueur des fragments indiquent que l'intégration s'est faite par transposition (Figure 2).

En conclusion, il semble que la combinaison d'*Agrobacterium* pour le transfert, et Ac pour l'intégration donne lieu à une transformation génétique chez l'orge. La méthodologie par injection des fleurs est applicable, en principe, sur toutes les plantes en floraison. Pour les autres plantes la micro-injection de méristèmes est la méthode de choix.

Expériences utilisant le transfert d'ADN par bombardement biolistique et intégration par transposase Ac

Dans ces expériences, nous avons utilisé des microspores d'orge « Igri » et de blé « Jo » pour la mise au point de la technique de bombardement et la sélection des plantules transformées.

Le stade de développement des microspores pour cette mise au point n'était pas idéal pour l'obtention de plantes transformées. Nous avons donc pris des cals et des embryons en développement, passé le stade de 32 cellules.

Les gènes utilisés ont été pourvus d'une séquence d'amplification d'expression *shl-exl-inl* (exint) provenant du gène de la sucrose synthase 1 de maïs [6]. Cette séquence permet une expression 1 000 fois plus élevée d'un ARNm dans les céréales. Le gène de transposase Ac, le gène *uidA* et le gène *bar* ont été mis sous contrôle du promoteur 35S et leur traduction sous contrôle de *shl-exl-inl*. La partie terminale des gènes n'a pas été modifiée.

Des microcals embryogènes, provenant de microspores d'« Igri », sont filtrés sur une membrane de fibre de verre et bombardés avec des particules d'or de 1,6 microns sur lesquels un ADN plasmidique, contenant le gène GUS (exint), est fixé. En utilisant une pression de 1 300 psi (90 bars) et une distance de 6 cm, jusqu'à 25 % des microcals développent des taches bleues lors d'une incubation avec X-gluc, 24 ou 48 heures après le bombardement.

Il s'agit, dans ce cas, d'une expression transitoire.

Des microcals embryogènes, provenant de microspores de Jo, ont été traités de la même manière avec un mélange d'ADN plasmidique contenant (A) le gène BAR35S(exint) encadré des bordures d'Ac et (B) contenant le gène de transposase Ac TPN35S (exint). Une semaine après le bombardement, les microcals sont mis sur un milieu sélectif contenant 10 µg/ml de phosphinotricine (substance active du Basta).

Après un mois, 3/40 (7 %) des cals ont développé des feuilles vertes, les autres étant complètement nécrosés. On n'a pas observé de racines.

Cette dernière expérience montre qu'il est possible de transformer efficacement une partie du tissu embryogène par un bombardement biolistique, si l'on utilise un système de transposition et des promoteurs forts, combinés avec des amplificateurs de traduction.

Dans le futur, le bombardement de microspores sera effectué avant la première division, afin d'éviter la production de plantes chimères qui ne sont que partiellement transformées.

Cette méthodologie est applicable, en principe, à toutes les plantes qui peuvent être régénérées à partir d'une seule cellule. Dans le cas de microspores, on peut obtenir, en une seule étape, des plantes, homozygotes pour le gène introduit.

Note et remerciements :

Ce travail a été publié sous forme de brevet :

Canada : 2089072

Europe : PCT/EP91/01883

États-Unis : 984, 436

Japon : 3-515938

Date de priorité : 27/09/90

Nous remercions Mrs L. Matton et P. Matton de la S.A. Clovis Matton et le Gouvernement Flamand pour le support de ce travail.

Références

1. Dale P, Marks M, Brown M, Woolston C, Gunn H, Mullineaux P, Kemp J, Chen D, Gil-mour M, Flavell R (1988). Seventh Wheat Genetics Symposium, Cambridge UK : 719-722.
2. Döring HP, Tiilmann E, Starlinger P (1984). *Nature* 307 : 127-130.
3. Grimsley N, Hohn T, Davies JW, Hohn B (1987). *Nature* 325 : 177-179.
4. Grimsley N, Ramos C, Hein T, Hohn B (1988). *Biotechnology* 6 : 185-189.
5. Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC (1987). *Nature* 327 : 70-73.
6. Maas C, Laufs J, Grant S, Korfhage C, Werr W (1991). *Plant Mol Biol* 16 : 199-207.
7. Pohlman R, Fedoroff N, Messing J (1984). *Cell* 37 : 635-643.

Littérature récente sur la transformation des céréales :

Forgeois *et al.* (1993). Actes du colloque AUPELF UREF de Rabat.

Creissen G, Smith C, Francis R, Reynolds H, Mullineaux P (1990). *Plant Cell Rep* 8 : 680-683.

Klein TM, Arentzen R, Lewis PA, Fitzpatrick-McElligott S (1992). *Biotechnology* 10 : 286-291.

Vasil IK (1993). *Biotechnology* 11 : 1153-1157.



Achevé d'imprimer par Corlet, Imprimeur, S.A.
14110 Condé-sur-Noireau (France)
N° d'imprimeur : 7204/232 - Dépôt légal : mars 1995
Mise en pages : Reprotyp - 14110 Condé-sur-Noireau
Imprimé en C.E.E

La collection *Universités francophones*, créée en 1988 à l'initiative de l'UREF, propose des ouvrages de référence, des manuels spécialisés et des actes de colloques scientifiques aux étudiants de 2^e et 3^e cycle universitaire ainsi qu'aux chercheurs francophones et se compose de titres originaux paraissant régulièrement.

Leurs auteurs appartiennent conjointement aux pays du Sud et du Nord et rendent compte des résultats de recherches et des études récentes entreprises en français à travers le monde. Ils permettent à cette collection pluri-disciplinaire de couvrir progressivement l'ensemble des enseignements universitaires en français.

Enfin, la vente des ouvrages à un prix préférentiel destiné aux pays du Sud tient compte des exigences économiques nationales et assure une diffusion adaptée aux pays francophones.

Ainsi, la collection Universités francophones constitue une bibliothèque de référence comprenant des ouvrages universitaires répondant aux besoins des étudiants de langue française.

220,00 FF

60,00 FF – UREF / Prix préférentiel : Afrique, Asie, Amérique du Sud, Haïti

59.4639.7



9

782742 000753

