

LE TRANSFERT DE GENES CHEZ LES PLANTES, MISE EN PERSPECTIVE.

Yves Chupeau, Institut Jean-Pierre Bourgin,
Centre INRA de Versailles-Grignon,
78026 Versailles Cedex
chupeau@versailles.inra.fr

1 - Perspective historique rapide

Après la découverte de la structure de l'ADN en 1953, l'essor de la microbiologie moderne résulte pour l'essentiel du développement des concepts et des techniques de la biologie moléculaire. Dans ce contexte, et dès les années 60, il était clair pour quelques biologistes qu'il faudrait disposer des techniques de transfert de gènes afin d'élucider l'organisation et l'expression des gènes, ainsi que la régulation de leur expression, puis leur rôle dans le contrôle du développement des organismes.

De fait, pour certains d'entre nous, cette projection constituait l'une des principales motivations intellectuelles pour s'engager dans les perfectionnements fastidieux de la culture *in vitro*. Notre objectif concernait la définition des conditions expérimentales propices à la réalisation effective du transfert de gènes. Dès 1965 en effet, cet objectif paraissait plus réaliste pour les cellules végétales dont les capacités de totipotence étaient déjà démontrées expérimentalement, au moins pour les espèces modèles de l'époque : le tabac et la carotte.

Cependant, la paroi pecto-cellulosique des cellules végétales constituait un obstacle de taille à la pénétration d'ADN vers le cytoplasme, puis le noyau des cellules cibles. Dans ce contexte spécifique des cellules végétales, l'idée de faciliter la pénétration d'ADN a également incité les équipes spécialisées à perfectionner les approches pionnières concernant l'obtention de protoplastes de cellules végétales (Cocking, 1960). De fait ces possibilités ont été vérifiées assez rapidement par les virologistes, qui ont utilisé des protoplastes de tabac pour l'étude de la pénétration de virus et d'acides nucléiques viraux (Aoki et Takebe, 1969).

En dépit de ces acquis techniques, les premières tentatives de transfert d'ADN radioactif à l'aide de protoplastes (Ohyama et al, 1972), voire sur des plantes entières (Ledoux et al., 1974) se sont révélées peu concluantes, essentiellement en raison du manque de dispositif de sélection puis de caractérisation biologique et moléculaire d'éventuels rares événements de transfert.

Pourtant, dès le début des années 70 des progrès décisifs dans deux domaines d'investigation vont apporter les éléments techniques véritablement déterminants pour le génie génétique :

- La capacité effective de régénérer des plantes fertiles "en masse" à partir de culture *in vitro* de protoplastes isolés de feuilles sur le tabac (Nitsch et Ohyama, 1971). Cette vérification expérimentale éclatante de la totipotence des cellules végétales sera ultérieurement étendue à de nombreuses espèces végétales (Davey et al., 2005).
- La découverte des plasmides de bactéries, et la caractérisation de leur rôle essentiel dans les processus naturels de transfert de gènes chez les bactéries (Cohen et al., 1970).

L'utilisation expérimentale des plasmides constitue effectivement l'un des tournants décisifs pour la microbiologie, mais aussi pour le génie génétique appliqué aux plantes pour deux raisons essentielles.

En premier lieu, pour un aspect technique qui reposait sur la sélection par les gènes marqueurs utilisés chez les bactéries. Les gènes de résistance aux antibiotiques, pour la plupart directement efficaces pour les cellules végétales, ont été très utiles pour les premières mises au point des processus de transfert de gènes aux plantes (Barton et al., 1983; Herrera-Estrella et al., 1983).

En second lieu, la révélation de la présence de plasmides variés chez la majorité des bactéries a renouvelé de façon lumineuse la façon d'étudier la bactérie du sol *Agrobacterium tumefaciens*, suspectée, en raison d'indications indirectes, de la capacité de transférer des gènes aux plantes.

Ces bactéries découvertes à la fin du 19^{ème} siècle sont les agents responsables de la maladie de la "Galle du collet" qui résulte de la croissance anormale des tissus de la plante infectée au site de blessure (Smith et Townsend, 1907). Ces bactéries ont été étudiées pendant tout le 20^{ème} siècle par les spécialistes de la culture *in vitro* de tissus végétaux, en raison de l'aptitude de ces tissus de "galle" de se développer *in vitro* en absence de substances de croissance, contrairement à la majorité des tissus végétaux qui nécessitent auxine et cytokinine pour de développer de façon continue *in vitro*. Plus intrigant, ces tissus synthétisent des composés inusuels chez les plantes, les opines, qui servent de sources de carbone et d'azote spécifiques pour les bactéries initiatrices des galls, ce qui avait conduit à l'hypothèse d'un transfert de gènes des bactéries vers les cellules végétales "transformées" (Braun, 1947 ; Petit et Tourneur, 1972).

Cette hypothèse hardie pour l'époque, a été parfaitement confirmée après la mise en évidence d'un plasmide de grande taille, le plasmide Ti (tumor inducing) spécifique d'*Agrobacterium tumefaciens*, puis la révélation de son rôle dans la formation des "tumeurs" de plantes (Van Larebeke et al., 1975). Depuis lors, les différentes phases du processus de transfert de gènes ont été élucidées. Le processus naturel et sophistiqué déployé par ces micro-organismes consiste à réorienter le métabolisme des cellules végétales, afin de favoriser la nutrition et la sexualité des agrobactéries initiatrices. Le processus repose sur un ensemble coordonné de dispositifs qui résultent du transfert spécifique vers les noyaux des cellules végétales d'une portion de plasmide, L'ADN -T (transféré) qui comporte un ensemble de gènes fonctionnels dans un environnement végétal (pour revue Zupan et al., 2000 ; Gelvin, 2003).

C'est ce système naturel de transfert qui permettra les premiers transferts expérimentaux de gènes aux cellules de tabac, puis la régénération des premières plantes transgéniques expérimentales (Barton et al, 1983; Herrera-Estrella et al., 1983).

Aujourd'hui ce sont effectivement les propriétés des agrobactéries qui sont le plus souvent mises à profit pour les transferts de gènes expérimentaux, mais d'autres procédés ont été développés (Table 1), qualifiés de « transfert direct », qui reposent sur des plasmides d'*Escherichia coli* (revue Potrykus, 1990). Le principe général de ces procédés repose sur la possibilité de délivrer des quantités importantes d'ADN à transférer dans le noyau des cellules cibles au moyen de procédures de perméation efficaces, qui ne détériorent pas irrémédiablement les cellules cibles. Désormais, la façon usuelle de préparer les quantités requises des fragments d'ADN spécifiques consiste à insérer ces fragments dans des plasmides amplifiables de bactéries (Sambrook et al., 1989).

Table 1: Procédés de transfert de gènes chez les plantes

Procédé	Référence	année
Transfert au génome nucléaire		
Explants + <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Barton et al.; Herrera-Estrella et al.,	1983
Protoplastes + Polyéthylène glycol	Paszkowski et al.	1984
Protoplastes + Liposomes	Caboche et al.	1985
Protoplastes + Micro-injection	Morikawa et al.	1985
Protoplastes + Électroporation	Fromm et al.	1986
Graines + <i>Agrobacterium t.</i>	Feldman et Marks	1987
Explants + Biolistique	Sandford	1988
Explants + Électroporation	d'Halluin et al.	1992
Plantes entières + <i>Agrobacterium t.</i>	Bechtold et al.,	1993
Transfert au génome chloroplastique		
Explants + <i>Agrobacterium</i>	de Block et al.,	1985
Chlamydomonas + Biolistique	Boynton et al.,	1988
Feuilles + Biolistique	Svab et al.,	1990
Protoplastes + PEG	Golds et al.,	1993
Transfert au génome mitochondrial : pas encore disponible pour les plantes		
Levure + biolistique	Johnston et al.,	1988
Chlamydomonas + biolistique	Boynton et Gillham,	1996

Nous n'abordons dans cette rapide perspective que les procédés les plus usuels, en gardant à l'esprit que ces processus se diversifient et se perfectionnent en s'enrichissant régulièrement des progrès des connaissances sur les génomes et leurs fonctionnements. On peut raisonnablement espérer des progrès assez rapides dans la compréhension du processus d'intégration (Li et al., 2005).

Les procédés de transfert de gènes représentent déjà des outils scientifiques, désormais indispensables dans de nombreux domaines de la génétique et de la physiologie.

Associés aux acquis de la génomique, ces procédés de transfert de gènes offrent des outils complémentaires, qui ouvrent de nombreuses perspectives d'amélioration de plus en plus ciblée des plantes.

2 - Visualisation de l'expression des transgènes

L'utilisation de gènes rapporteurs, dont l'expression dans les cellules cibles est visible ou mesurable, ou de marqueurs qui permettent de sélectionner les cellules effectivement transformées de façon stable, constituent des outils incontournables pour l'élaboration des conditions efficaces de transfert quels que soient les procédés ou les vecteurs utilisés.

Les gènes rapporteurs initiaux *cat* (chloramphenicol acetyltransferase) et *nptII* (neomycin phosphotransferase) reposaient sur des mesures de radioactivité sur les extraits des tissus végétaux transformés. Ces procédés assez lourds ont été supplantés par des réactions colorées visibles directement et *in situ* à l'aide du gène *gus* (β -glucuronidase) et désormais sur des cellules vivantes avec l'expression d'un gène de méduse : *gfp* (green fluorescent protein). Ces procédés permettent d'ailleurs le développement de nouveaux dispositifs d'étude de la fonction et de la régulation des gènes par expression transitoire (voir Sheen, 2001), de plus en plus performants (localisation cellulaire) car la palette des marqueurs fluorescents se complète régulièrement (Shaner et al., 2004).

Ces détections précises se révèlent précieuses pour affiner les procédures de transfert de gènes. La quantification du nombre de cellules transformées de façon transitoire (jusqu'à 90% dans les systèmes les plus homogènes - Sheen, 2001), se révèle un des paramètres importants pour l'efficacité de la transformation stable (Yoshioka et al., 1996).

En effet, malgré la proportion importante de cellules qui expriment les transgènes de façon transitoire, la transformation stable, résultant d'une insertion correcte de la séquence nucléotidique complète, reste un événement rare et variable selon les cellules cibles et les procédures : de l'ordre de une pour mille, voire une pour cent mille cellules traitées. Les procédés de sélection initiaux reposaient sur les gènes "marqueurs" largement utilisés chez les micro-organismes qui codent des protéines de détoxification d'antibiotiques (kanamycine, hygromycine ...), puis d'herbicides (glyphosate, phosphinothricine ...), efficaces et pratiques ces gènes sont toujours utilisés dans les approches expérimentales (Potrykus, 1990).

Cependant, d'une part de nombreuses voies se sont élevées contre l'utilisation de ces gènes bactériens dans les plantes cultivées, d'autre part (et surtout) il importe de disposer de marqueurs variés afin d'être en mesure d'ajouter des transgènes différents dans une même plante.

Cet impératif motive deux axes de raffinement complémentaires : la recherche de dispositifs qui permettent d'exciser les gènes marqueurs, ainsi que la diversification des procédés de sélection.

Deux exemples sont révélateurs de cette diversification.

La surexpression d'un gène d'*Arabidopsis* qui code un transporteur de type ABC, confère la résistance à la kanamycine chez le tabac (Mentewab et Stewart, 2005); l'utilisation d'un gène du métabolisme bactérien (la phosphomannose isomérase) permet de sélectionner les cellules transformées par leur aptitude à utiliser le mannose, sélection positive qui se révèle bénéfique tout spécialement pour les espèces considérées comme récalcitrantes (Joersbo et al., 1998).

La suppression des gènes marqueurs fait appel à trois types de démarches.

En premier lieu, il est possible de provoquer l'intégration de la "séquence marqueur" en un site différent de celle du transgène agronomique, lorsque ces séquences sont insérées sur deux plasmides différents. Il est ensuite possible de ségréger ces deux séquences dans les descendances de la plante transgénique (Komari et al., 1996). Cependant, une proportion assez importante d'événements d'intégration comporte les deux gènes souvent liés au même site (Stuitje et al., 2003).

Une autre façon d'éliminer les gènes marqueurs repose sur la possibilité de les exciser de façon spécifique au moyen de nucléases. Le dispositif type combine l'action d'un gène de

recombinase bactérienne (*Cre*) pour cliver l'ADN aux sites spécifiques (*Lox*), initialement utilisé pour exciser du génome d'un tabac transgénique une séquence *nptII* flanquée de deux sites *lox* (Dale et Ow, 1991). D'autres dispositifs sont expérimentés (Puchta, 2003) et récemment, un système à deux sites de recombinaison spécifique est proposé pour éliminer des séquences immédiatement après l'insertion des transgènes (Srivastava et Ow, 2004).

Il faut garder à l'esprit que le transfert de gènes de nucléases bactériennes aux plantes ne constitue pas une opération totalement anodine, puisque des sites *Lox* fonctionnels, par exemple, existent dans le génome chloroplastique (Corneille et al., 2003).

Enfin, il est désormais envisageable de se passer de gènes de sélection, en raison des raffinements des procédures de transfert de gènes, et du recours à la PCR pour détecter l'insertion des séquences d'intérêt. Certes cette possibilité repose sur des rendements élevés de plantes transgéniques (Aziz et Machray, 2003). Cependant, le fait qu'elle soit applicable en accompagnement des procédures classiques (co-culture avec des agrobactéries) de transfert de gène à la pomme de terre par exemple (de Vetten et al., 2003) constitue une information qui laisse augurer positivement des possibilités concrètes de cette pratique.

La sélection d'évènements de transfert de gènes dans le génome chloroplastique s'effectue dans un contexte assez spécifique, dû au caractère très polyploïde du génome chloroplastique (Maliga, 2004). Une feuille de tabac, par exemple, comporte de l'ordre d'une centaine de chloroplastes, contenant chacun de l'ordre de dix nucléoïdes, qui comportent plusieurs copies du génome chloroplastique.

Il y a donc entre mille et dix mille plastomes par cellule, d'où la nécessité de systèmes de sélection adaptés et efficaces. Les résistances à la streptomycine et la lincomycine sont les plus utilisées pour la sélection de chloroplastes transgéniques. Ces antibiotiques, qui bloquent la synthèse des protéines des plastomes mais pas celle du cytoplasme, ne sont pas délétères pour les cellules en culture *in vitro*. En raison du nombre élevé de génomes de chloroplastes par cellule, il faut considérer qu'au minimum vingt divisions cellulaires en conditions sélectives sont nécessaires pour obtenir quelques cellules homoplastomiques, donc la possibilité de régénérer des plantes homoplastomiques (en partant de fragments de feuilles, plusieurs séquences de régénérations de bourgeons peuvent se révéler indispensables).

La deuxième différence importante avec le génome nucléaire réside dans le fait que l'insertion de transgènes dans le génome chloroplastique résulte essentiellement de recombinaisons homologues, à l'instar des bactéries, il faut donc incorporer dans les constructions des séquences homologues choisies dans les séquences intergéniques des plastomes (Maliga, 2004).

Un travail récent sur le tabac, indique que la fréquence de transformation chloroplastique peut être fortement augmentée en utilisant des cellules en culture *in vitro*. Bien que les plastomes soient moins nombreux et plus petits que dans des feuilles fonctionnelles, l'efficacité de la transformation pourrait résulter de la sélection plus rapide de l'homoplastomie (Langbecker et al., 2004).

Alors que les procédés de transformation expérimentale des mitochondries sont disponibles chez la levure (Johnston et al., 1988) et l'algue verte *Chlamydomonas* (Boynton et Gillham, 1996), les tentatives chez les plantes se sont révélées infructueuses jusqu'à aujourd'hui. La complexité, la polyploïdie et la plasticité du chondriome chez les plantes imposent sans doute des procédures de sélection encore plus efficaces et spécifiques que celles utilisées pour la sélection de chloroplastes transgéniques.

Ces difficultés expérimentales ne cessent de surprendre, surtout depuis que l'on connaît l'extraordinaire efficacité du transfert horizontal de gènes aux génomes mitochondriaux de plantes dans les conditions naturelles (Bergthorsson et al., 2004).

3 - Les principales techniques de transfert de gènes

Utilisation des vecteurs naturels d'*Agrobacterium*

Ainsi que nous l'avons évoqué en introduction, les agrobactéries du sol (*A. tumefaciens* et *A. rhizogenes*) ont acquis la capacité de dévier le métabolisme des cellules végétales pour leur bénéfice, grâce à un mécanisme complexe de transfert vers les cellules cibles d'un ensemble de gènes (ADN-T) dont les produits participent conjointement à la production en masse d'opines. Ces opines (condensation acide aminé-sucre ou acide organique-a.aminé) constituent à la fois des sources de carbone et d'azote pour les agrobactéries, mais aussi des inducteurs de conjugaison (pour revue Zupan et al., 2000 ; Gelvin, 2003).

En résumé, les différentes étapes naturelles du transfert de l'ADN-T sont contrôlées par au moins 40 à 50 gènes qualifiés de gènes de virulence, dont certains sont portés par les chromosomes de la bactérie, mais la majorité sont localisés sur des plasmides de taille importante (200 à 300 kb), les plasmides Ti (tumor inducing) ou Ri (root inducing). Ces gènes de virulence sont naturellement induits par des substances diffusées dans le sol par des cellules végétales blessées (phénols, type acetosynringone), qui stimulent un activateur de transcription à deux constituants (*Vir A+Vir G*) spécifique pour l'ensemble des gènes de virulence.

Le processus déployé par ces bactéries résulte pour l'essentiel de l'évolution d'un complexe (au moins 11 protéines) de sécrétion de protéine de type IV, rendu efficace pour la sécrétion d'un complexe nucléo-protéique.

D'autres éléments importants des gènes de virulence sont des nucléases spécifiques de séquences de 24 paires de bases qui encadrent les gènes de l'ADN-T. La nucléase VirD2 par exemple excise l'ADN-T simple brin du plasmide Ti en restant fixée à l'extrémité 5' afin de la protéger de "conduire" l'ADN-T au noyau des cellules cibles. La protéine VirE2 est spécifiquement associée à l'ADN-T simple brin afin également de le protéger de nucléases végétales et de le maintenir dans une forme linéaire afin de faciliter les étapes du transfert de la cellule bactérienne vers le noyau de la cellule cible.

Contrairement à ce que l'on a souvent lu et entendu, il est important de bien noter ici que les agrobactéries ne constituent pas à proprement parler un système de transfert de gènes, les fonctions que nous venons de survoler ne comportent pas le contrôle de l'intégration de l'ADN, qui semble entièrement dépendre d'activités de réparation de l'ADN de la plante receveuse (Li et al., 2005). Le dispositif mis en place par les agrobactéries conduit à un fléchage très efficace de l'ADN-T vers les noyaux végétaux dans lesquels il est rapidement converti en ADN double brin, puis exprimé. Les bactéries tirent alors bénéfice de la production d'opines, qui résulte de l'expression transitoire de l'ADN-T.

L'insertion dans les chromosomes de plantes, conséquence accessoire, peut se produire avec une bonne fréquence en raison des quantités importantes d'ADN-T présentes dans les noyaux...

Ce fléchage très efficace, associé à la capacité des bactéries de s'infiltrer dans les tissus végétaux, fournit d'ailleurs la possibilité d'utiliser les agrobactéries pour des expériences d'expression transitoire systémique *in situ* soit en inoculant des feuilles (Marillonnet et al., 2005), ou des fruits (Orzaez et al., 2006) ce qui complète les dispositifs utilisant des protoplastes.

La pratique du transfert de gènes chez les plantes débute par la démonstration expérimentale que les gènes "marqueurs" insérés dans l'ADN-T (associés aux séquences de contrôle de l'expression de plante), sont effectivement transférés et intégrés dans le génome des cellules cibles (Barton et al., 1983; Herrera-Estrella et al., 1983). Cependant, la taille et la complexité des plasmides Ri ou Ti, constituaient des obstacles à leur utilisation pratique. Pour les

utilisations routinières des agrobactéries, deux informations se sont révélées cruciales : l'ADN-T ne comporte pas de gènes actifs dans le processus même de transfert d'ADN, et surtout les seuls éléments essentiels sont les deux séquences répétées, de 24 paires de bases, qui bordent l'ADN-T et qui constituent les sites d'excision de l'ADN-T simple brin destiné à être exporté vers les cellules végétales.

La démonstration que les nucléases d'excision, et toutes les protéines du processus de transfert, étaient actives sur ces séquences insérées dans des plasmides de *E. coli*, a permis d'utiliser ces plasmides bien connus dans des systèmes désormais qualifiés de systèmes binaires (Hoekema et al., 1983; de Frammond et al., 1983).

Généralement, ces systèmes sont constitués d'une agrobactérie, le plus souvent résistante à la rifampicine, qui porte les gènes chromosomiques d'attachement à la paroi végétale, et comporte un plasmide Ti (déléte de l'ADN-T natif, mais complété par un gène de résistance à un antibiotique) qui fournit les gènes de virulence contrôlant le transfert. Ce système est complété par un plasmide de *E. coli* qui comporte une origine de répllication fonctionnelle à la fois dans *E. coli* et dans les agrobactéries, une résistance à un autre antibiotique, ainsi que les constructions à transférer dans des sites de clonage encadrées par les séquences bordures de l'ADN-T.

Cette trame générale a donné lieu à de nombreuses variations et adaptations, en fonction des objectifs et des tissus cibles. Un guide très utile pour approcher cette variété repose sur une revue des systèmes binaires (Hellens et al., 2000).

Pour être complet, il faut signaler que ces dispositifs de transfert par les agrobactéries sont également efficaces sur les levures (Bundock et Hooikaas, 1996), les champignons filamenteux (de Groot et al., 1998) et même les cellules humaines (Kunik et al., 2001).

En pratique, les bactéries hébergeant les vecteurs binaires sont cultivés sur des milieux sélectifs afin de maintenir les deux types de plasmides. Ces bactéries sont mises en contact avec les explants végétaux, pour initier le transfert de l'ADN-T. Les explants sont choisis en fonction de leurs caractéristiques et surtout de leur aptitude à la régénération de plantes, les plus utilisés sont les fragments de feuilles (Horsch et al., 1985).

Ces explants sont incubés (ou co-cultivés) avec les agrobactéries pendant des périodes variables (de quelques heures à quelques jours) selon la souche de bactérie et la sensibilité de l'explant. Le plus fréquemment l'incubation dure 48h (Gelvin, 2003). Ensuite, les tissus végétaux sont transplantés sur des milieux de culture favorables à la régénération et généralement additionnés d'un antibiotique, non toxique pour les cellules végétales (céfotaxime, carbénicilline, augmentin), afin d'éliminer les agrobactéries (Hellens et al., 2000).

L'évolution de la "domestication" des agrobactéries

Initialement, les agrobactéries ont été mises à profit expérimentalement sans modifier leur spectre d'hôtes, de sorte que leur utilisation se trouvait cantonnée aux plantes dicotylédones, car naturellement les monocotylédones, et spécialement les céréales, ne sont pas sensibles aux agrobactéries. Cette limitation importante, qui a d'ailleurs fortement incité à la recherche d'autres processus de transfert de gènes, a également contribué à mieux appréhender le support de la spécificité d'hôtes par l'étude de la régulation des gènes de virulence.

L'étude de souches d'agrobactéries "super-virulentes" a permis de mettre en évidence que la surexpression de VirG, l'inducteur de l'expression des autres gènes de virulence, couplée à l'utilisation d'acétosyringone (inducteur de l'autophosphorylation de VirA) permettait de transformer expérimentalement des céréales. Le transfert de gènes aux céréales est également amélioré par l'utilisation de vecteurs "super-binaires", dont les plasmides de virulence

comportent des copies supplémentaires de *virB* et *virC* (Hiei et al., 1994). Dans la même ligne, un système de vecteurs "ternaire", propose d'incorporer dans les agrobactéries un plasmide supplémentaire de *E. coli* comportant un gène *virG* surexprimé de façon constitutive (Van der Fits et al., 2000).

Ces dispositifs de transfert améliorés se révèlent très efficaces sur des cellules en division, ce qui est le cas pour les céréales dans de jeunes embryons cultivés *in vitro* (Ishida et al., 1996). Enfin, il faut mentionner que des vecteurs, de type chromosome artificiel, ont également été développés pour transférer de grands fragments d'ADN, jusqu'à 150 kb (Shibata et Liu, 2000), ce qui se révèle très utile pour les démarches de clonage positionnel, l'identification d'allèles ou bien pour transférer plusieurs gènes à la fois (Cao et al., 2004).

Transfert de gènes *in planta* à l'aide d'agrobactéries

L'une des tendances fortes des recherches d'amélioration des techniques de transfert de gènes concerne la possibilité de s'affranchir de l'étape fastidieuse et le plus souvent limitante de la culture *in vitro*.

Après les succès initiaux obtenus par l'inoculation de graines d'*Arabidopsis thaliana* en germination (Feldmann et Marks, 1987), la mise au point de l'infiltration d'agrobactéries sous vide partiel a fourni la procédure pratique attendue, permettant de générer rapidement les premières collections de mutants d'insertion chez *Arabidopsis* (Bechtold et al., 1993).

En pratique le transfert *in planta* consiste à immerger de jeunes plantes d'*Arabidopsis* dans une suspension de bactéries, et de forcer la pénétration d'agrobactéries dans les inflorescences en imposant un vide partiel. Les plantes traitées sont ensuite élevées en serre pour en récolter les graines, et de les semer sur des milieux sélectifs (antibiotiques, herbicides, ...) pour repérer les événements de transfert dans la descendance.

La plupart des plantes transformées sont hémizygotes, non chimériques, et les variations somaclonales dues à la culture *in vitro* sont évitées.

Sans qu'il soit totalement vérifié que la germination du pollen procure le transport des bactéries, l'analyse détaillée du processus révèle que ce sont les gametophytes femelles qui sont ciblés par les agrobactéries (Bechtold et al. 2000). Cette méthode est encore simplifiée par l'utilisation d'un mouillant à la place du vide (Clough et Bent, 1998).

Cependant, cette méthode n'est applicable en routine que pour quelques membres de la famille des Brassicacées (Curtis, 2005). Il reste à en vérifier la portée pour d'autres espèces, de même que les dispositifs, qui font appel au transport d'ADN par le tube pollinique lors de la fécondation, utilisés chez le cotonnier (Zhou et al., 1983).

Transfert direct provoqué par le polyéthylène glycol

La propriété du polyéthylène glycol (PEG) d'induire la fusion des membranes de protoplastes adjacents est connue depuis plus de trente ans (Wallin et al., 1974; Kao et Michayluk, 1974). Cette propriété résulte de la capture des molécules d'eau par le PEG à forte concentration, ce qui abolit la cohésion de l'édifice membranaire qui résulte de l'hydrophobicité des têtes non polaires des phospholipides constitutifs (Lentz et Lee, 1999). Cependant, cette déstabilisation est réversible par dilution de la solution de PEG, ce qui permet d'ailleurs d'obtenir des hétérocaryons viables puis des hybrides somatiques (revue Davey et al., 2005).

Ce même processus a été mis à profit pour induire la pénétration d'ADN dans des protoplastes car, en plus de la perméation, le PEG induit également la précipitation de l'ADN en complexes protecteurs des nucléases (Paszkoswski et al., 1984). Le procédé consiste à mélanger les protoplastes et l'ADN que l'on souhaite transférer, puis à ajouter une solution de PEG (de 10 à 50%) additionnée de concentrations variables d'ions divalents (Ca^{++} , Mg^{++}) pendant des périodes limitées et adaptées (5 à 60 minutes), puis à diluer graduellement la solution de PEG par du milieu de culture des protoplastes. L'ensemble des paramètres doit

être adapté précisément aux protoplastes étudiés (Potrykus, 1990). Aujourd'hui ces procédés sont surtout utilisés pour les études d'expression transitoire (Sheen, 2001).

Transfert direct par électroporation

Assez rapidement d'autres façons de perméabiliser des protoplastes ont été explorées afin d'augmenter l'efficacité des transferts; initialement les procédés ont été dérivés de ceux utilisés sur les cellules animales comme l'utilisation de liposomes (Fralely et al., 1981) adaptée pour des protoplastes de tabac (Caboche et al., 1985).

L'électroporation, un autre procédé de perméation des membranes soumises à une décharge électrique, développée à l'origine pour la transformation de protoplastes de maïs (Fromm et al., 1986) était la méthode la plus populaire pour la transformation des céréales (Potrykus, 1990). Le principe de la technique exploite la déstabilisation temporaire du plasmalemme des protoplastes soumis à des champs électriques. La perméation induite par les décharges électriques est variable selon la taille des protoplastes et les caractéristiques des membranes, dans la pratique il faut adapter les paramètres (type et intensité du champ électrique, conductivité de la solution ...) pour chaque système expérimental. Cependant, il est possible de définir des conditions d'électroporation assez généralement efficaces (Chupeau et al., 1989).

Transfert direct par biolistique

Les difficultés fréquentes de la culture *in vitro*, ou la faible efficacité des processus de régénération de plantes, constituent les limitations les plus importantes à la généralisation des procédés de transfert de gènes à différentes espèces végétales. Le recours à la biolistique (Sandford, 1988) a permis de s'affranchir des limitations dues à la culture *in vitro*, par la capacité des micro-projectiles vecteurs d'ADN de pénétrer dans des tissus et organes variés en ciblant spécifiquement ceux capables d'exprimer leur totipotence (méristèmes, embryons, suspension embryogène...). En outre, ce procédé permettait également de surmonter les limitations naturelles de spectre d'hôtes des agrobactéries.

Ce procédé consiste en la précipitation par l'alcool de l'ADN à transférer sur des particules d'or ou de tungstène de 1 à 2 microns (Maliga, 2004), ces particules sont ensuite soumises à des accélérations qui leur permettent de traverser les parois cellulaires. Les dispositifs faisant intervenir des mélanges explosifs (Sanford, 1988) ont été rapidement supplantés par des dispositifs plus souples et plus adaptés. La détente rapide d'hélium sous pression permet ainsi d'accélérer des particules enrobées d'ADN de façon contrôlée et stérile (Johnston, 1990).

Le transfert par biolistique a été adopté et adapté par de nombreuses équipes tant pour l'expression transitoire que pour la transformation stable. En effet, ce procédé se révèle pratique et économique : les efficacités de transferts sont indépendantes du génotype à transformer et affranchies des complications de la culture *in vitro* (Taylor et Fauquet, 2002).

Cependant, ces procédés biolistiques sont assez largement surpassés aujourd'hui, y compris pour les céréales, par les nouvelles générations d'agrobactéries (Afobali et al., 2004), mais ils restent les procédés favoris pour la transformation des chloroplastes (Maliga, 2004).

4 - Le processus d'intégration des transgènes

Le mécanisme d'intégration dans le génome nucléaire des plantes semble assez similaire, quelles que soient les différentes formes d'ADN utilisées (circulaire, linéaire, double brin, simple brin).

À la différence des microorganismes pour lesquels la recombinaison homologe constitue le processus le plus général, pour les plantes supérieures le mécanisme d'intégration dans le génome repose sur les activités de réparation des cassures double brin de l'ADN receveur (non

homologous end joining : NHEJ); mécanisme souvent qualifié (hélas) de recombinaison illégitime !

Le détail du mécanisme, assez complexe, n'est pas encore totalement élucidé.

Initialement, les travaux ont surtout porté sur l'intégration de l'ADN-T (ADN simple brin, excisé du plasmide Ti) qui faisait intervenir une cassure de l'ADN du receveur ainsi qu'une hybridation par des micro-homologies de 3 à 4 bases entre les bordures de l'ADN -T et l'ADN du génome receveur, suivie de la synthèse du brin complémentaire (Tinland, 1996). Récemment, un élégant système faisant intervenir une endonucléase (I-SceI) dont les sites sur l'ADN double brin sont très rares, permet de vérifier qu'en fait l'ADN-T est spécifiquement intégré aux sites de coupure double brin du génome receveur (Tzfira et al., 2003) et que l'ADN-T est converti en double brin avant intégration (ce qui explique d'ailleurs l'expression très rapide, et transitoire des gènes de l'ADN-T).

La vision actuelle du processus d'intégration s'oriente donc vers un mécanisme général de réparation faisant intervenir la ligation d'ADN double brin, sans intervention d'homologies de séquences. Il reste cependant à préciser le détail de ce processus (Friesner et al., 2003; Somers et Makarevitch, 2004), d'autant que les composantes du complexe de réparation de l'ADN, à l'oeuvre dans l'intégration des transgènes, semblent varier selon les types cellulaires (Gallego et al., 2003; Li et al., 2005).

Les transgènes s'intègrent dans les régions riches en gènes, pour *Arabidopsis*, bien que les insertions soient assez réparties sur l'ensemble du génome, elle sont moins fréquentes dans les régions centromériques (Alonso et al., 2003) et plus fréquentes dans les séquences de promoteurs de transcription (Bako et al., 2003).

L'efficacité des processus de réparation des cassures double brin, absolument critique pour la survie, constitue l'une des difficultés majeures dans les démarches de caractérisation d'évènements de recombinaison homologues chez les plantes supérieures, bien qu'il soit possible d'en sélectionner à l'aide de systèmes sophistiqués (Lida et Terada, 2004).

La faible fréquence de ces évènements de recombinaison homologue n'a pas encore permis de développer des outils réellement pratiques de ciblage des sites d'insertion, ce qui ne facilite pas les démarches de génétique inverse.

5 - Le transfert de gène : outil scientifique

Depuis vingt ans, la combinaison des techniques de la génomique et du transfert de gènes permet de renouveler entièrement les démarches de la biologie et tout spécialement l'étude du développement des organismes. La vitesse de caractérisation des gènes s'est considérablement accélérée avec la publication de la séquence complète du génome d'un écotype d'*Arabidopsis* (The AGI, 2000) puis de celui du riz (Yuan et al., 2003), et s'accéléreront encore avec la connaissance des autres génomes en cours de séquençage (peuplier, luzerne, tomate...).

Ces informations se révèlent précieuses pour les comparaisons d'organisation des génomes, et l'approche génomique de l'évolution dans les différentes familles de plantes. La phylogénie moléculaire permet désormais de compléter et de préciser les notions de filiations tracées par la botanique. Cependant, le séquençage ne fournit qu'une information limitée, car, pour de nombreuses séquences, il reste à caractériser les fonctions, les régulations.

La révélation de la répartition des sites d'insertion des transgènes dans l'ensemble du génome a orienté l'utilisation du transfert de gènes dans deux grands objectifs.

Le premier objectif vise à combler le manque de dispositif pratique de ciblage des insertions par recombinaison homologue; ce qui a conduit à utiliser l'insertion au hasard de transgènes sélectionnables, pour générer des collections importantes de "mutants d'insertion". Ces dispositifs ont été initiés sur *Arabidopsis* (Bouchez et Hofte, 1998), en raison de la disponibilité du transfert *in planta* (Bechtold et al., 1993). Les équipes de l'Institut Jean-Pierre Bourgin, du Centre INRA de Versailles-Grignon, qui ont d'ailleurs joué un rôle précurseur

remarquable dans ces développements, gèrent aujourd'hui une collection de 55 000 mutants d'insertion, dont les informations viennent compléter l'ensemble des informations de génomique disponible sur cette espèce modèle, ainsi que les bases de données publiques disponibles au niveau mondial.

Ce principe peut s'appliquer de façon variée (Nishal et al., 2005), et avec d'autres outils tel que les transposons et sur d'autres plantes comme une luzerne -*Medicago truncatula* - (d'Erfurth et al., 2003) et le riz (Delseny et al., 2001).

Le second objectif concerne la caractérisation de la fonction d'une séquence d'ADN, par l'analyse de son expression à la suite de son transfert dans un génome receveur. Dans ce cas, l'utilisation des insertions les plus simples possible (une copie insérée en un seul site), et sans création de mutation est "privilégiée" afin de faciliter la caractérisation du phénotype résultant de la seule et simple expression du transgène.

Ce dispositif s'applique pleinement lorsque le transfert d'une séquence provoque la complémentation (réversion) d'un mutant caractérisé, ce qui fournit de fortes présomptions sur la fonction de la séquence transférée.

Le transfert de gènes procure également l'accès à l'analyse de la régulation du gène. Le transfert du gène natif dans une autre espèce, donc dans une régulation globale éventuellement différente, peut directement renseigner sur le rôle de la séquence codante ainsi que sur la chronologie et la localisation tissulaire de son expression. Ces données peuvent s'affiner en faisant varier les séquences promotrices associées (native, sur-expression ou sous-expression constitutives, tissu -voire cellule- spécifique).

Le transfert de gènes constitue, avant tout, un outil essentiel pour l'analyse fonctionnelle des gènes.

Depuis une vingtaine d'années, cet outil a permis de préciser les connaissances des voies métaboliques, que la biochimie classique avait tracé à grands traits. Ces précisions sont également précieuses même pour des voies de biosynthèses pourtant très fouillées en raison de leur intérêt industriel, comme la synthèse des lipides dans le monde végétal (Browse et Sommerville, 1991).

La biologie et plus spécialement l'étude du développement des plantes progresse plus rapidement depuis que l'on peut exploiter le transfert de gènes pour l'analyse du rôle des régulateurs clés de nombreux processus physiologiques. Cette ouverture apparaît cruciale chez les plantes, chez lesquelles le séquençage du génome révèle un nombre de facteurs de transcription supérieur, globalement, à celui détecté chez les animaux (The AGI, 2000).

L'analyse fonctionnelle des facteurs de transcription, par transfert de leurs séquences, a permis l'accès à la régulation globale des voies métaboliques (Loydd et al., 1992), ce qui conduit à la vision de plus en plus précise et globale pour des métabolismes essentiels mais complexes : les flavonoïdes (Vinkel-Shirley, 2001) ou les caroténoïdes (Hirschberg, 2001). Enfin, le transfert d'un facteur de transcription combiné avec l'analyse des "micro-arrays" procure la visualisation de l'activité du gène régulateur sur l'expression de centaines voire de milliers de gènes (Seki et al., 2001), ce qui ouvre l'accès à l'analyse de la régulation coordonnée de différents gènes pour des étapes cruciales du développement comme l'initiation de la floraison (Levy et Dean, 2005).

Chez *Arabidopsis*, la connaissance de la séquence du génome a conduit à la réalisation de micro-arrays pour l'ensemble des séquences (CATMA), il est donc possible de visualiser les effets de tel ou tel facteur de transcription sur l'ensemble des gènes, tout en couplant l'analyse avec les effets des variations de l'environnement sur l'expression des gènes.

Ainsi de la résistance au gel dont les effets sur les niveaux d'expression des gènes (Seki et al., 2001) se complètent aujourd'hui de la visualisation des répercussions sur l'ensemble des métabolites (Cook et al., 2005).

Ces dispositifs ouvrent des possibilités, insoupçonnées jusqu'alors, d'accès à la complexité des réseaux moléculaires, supports des cascades de régulations qui contrôlent les réactions des plantes tant aux stress de l'environnement, les agressions abiotiques (Vinocur et Altman, 2005), qu'aux attaques de pathogènes, les agressions biotiques (Hammond-Kosak et Parker, 2005).

Bien sûr ces avancées prodigieuses ne concernent aujourd'hui que le modèle *Arabidopsis*, mais les mêmes développements conceptuels et techniques vont progressivement s'appliquer pour les espèces cultivées, comme le riz (Yuan et al., 2003) et d'autant plus rapidement que l'on dispose de la "trame générale" des régulations sur *Arabidopsis*, et que cette trame s'affine sans cesse.

Plus prosaïquement, au niveau technique, le transfert de gènes procure des possibilités accrues de sophistication des techniques de microscopie. Les fusions avec les séquences de gènes rapporteurs détectables sur cellules vivantes permettent de préciser à la cellule près, le moment, le lieu et en partie le niveau d'activation et d'expression d'une séquence qu'elle soit régulatrice ou fonctionnelle (Brandizzi et al., 2002).

Enfin, l'outil du transfert de gènes lui-même est l'objet de démarches d'amélioration qui enrichissent (et s'enrichissent à la fois de) l'avancée des connaissances sur le fonctionnement des génomes. Dans toutes les utilisations expérimentales ou pratiques du transfert de gènes le point crucial concerne la maîtrise du niveau d'expression des transgènes. L'une des possibilités de réduction de la variabilité du niveau d'expression consiste à incorporer des "MARs" (Matrix Attachment Region) dans la construction moléculaire (Xuc et al., 2005). Le phénomène d'extinction de l'expression des transgènes, (silencing) dans certaines plantes transgéniques, ouvre un champ entièrement nouveau d'étude de la régulation de l'activité des gènes. L'ARN-silencing repose sur le ciblage puis l'hydrolyse, donc la dégradation spécifique, de certaines séquences d'ARN. Le processus actif chez la plupart des eucaryotes, est probablement dérivé d'un mécanisme de défense contre les virus qui a évolué en dispositif de surveillance des ARN pour la défense cellulaire et le contrôle du développement (Mallory et Vaucheret, 2004).

Ces mécanismes faisant intervenir les produits de dégradation des séquences ciblées, les micro-ARN, soulèvent bien sûr des questions fondamentales sur les processus vitaux, mais ils fournissent déjà de nouveaux moyens expérimentaux pour l'analyse de l'expression des gènes (Hilson et al., 2004).

6 - Le transfert de gènes : Outil d'amélioration des plantes

L'ensemble des connaissances acquises, sur le fonctionnement des génomes, la biologie et le développement des végétaux, par le recours combiné à la génomique et au transfert de gènes ouvrent des perspectives renouvelées pour l'amélioration des plantes.

Les techniques de transfert elles-mêmes offrent désormais de vastes possibilités d'amélioration dont l'éventail se révèle intellectuellement bien plus attractif que les transferts de gènes bactériens de résistance aux herbicides, qui constituent l'essentiel des plantes transgéniques en culture à ce jour, mais qui reposent sur des éléments techniques finalement assez simples. Bien que simples (et controversées), ces applications initiales du transfert de gènes n'en constituent pas moins des succès agronomiques pour le soja (Carpenter, 2001). C'est également le cas pour les résistances aux insectes dans d'autres cultures (Mendelsohn et al., 2003). Les extensions de ces dispositifs au riz pour la résistance aux insectes (Huang et al., 2005) et aux herbicides (Cao et al., 2004) dans les conditions de production chinoises devraient apporter de nouvelles validations de l'intérêt agronomique de ces dispositifs.

Cependant et de façon plus excitante, l'une des toutes premières priorités pour des productions agricoles plus soutenables, concerne la protection contre les pathogènes de façon à sécuriser la production sans recours, ou avec un recours minimum, aux pesticides. La compréhension opérationnelle des interactions plantes-pathogènes (Hammond-Kosak et Parker, 2005) fournit les pistes essentielles pour chercher à augmenter les capacités de résistance "biologique" des plantes cultivées.

Dans ce domaine, les premières explorations ont concerné les résistances aux virus, avec les tentatives d'exploitation de la résistance induite par l'expression par les plantes de l'ARN ou de la protéine de capsid des virus. Cependant, la seule application réellement mise en pratique de ce mécanisme repose sur des papayers transgéniques, exprimant la capsid du Papaya Ring Spot Virus, qui ont permis de sauver la production de papaye à Hawaii (Gonsalves, 1998).

La résistance à divers isolats de mildiou (*Phytophthora infestans*) obtenue par transfert à la pomme de terre d'un gène de défense (type LRR) cloné dans un *Solanum* sauvage (*S. bulbocastanum*) procure un excellent exemple de ce que l'on peut qualifier d'amélioration ciblée des plantes. En effet sur le principe, le procédé ne diffère pas des méthodes de l'amélioration des plantes qui font appel à l'hybridation interspécifique pour introgresser des caractères d'intérêt. Dans ce cas, l'impossibilité de croiser les deux plantes, a conduit au clonage du gène de résistance caractérisé chez la plante sauvage (Song et al., 2003). Outre le transfert effectif de la résistance, le transfert à la pomme de terre, présente l'avantage (important dans le cas de la pomme de terre) de ne pas transférer d'autres gènes de l'espèce sauvage, donc de ne pas risquer d'effet négatif sur le phénotype. La résistance de ces pommes de terre transgéniques se révèle stable depuis trois ans en expérimentation agronomique (USA et Mexique).

Des tomates sur-exprimant le gène *NPR1* d'*Arabidopsis* se révèlent tolérantes à différents pathogènes (Lin et al., 2004). La protéine NPR1 est un élément clé de la régulation de la résistance systémique acquise chez *Arabidopsis*. Comme la voie de signalisation semble conservée chez les dicotylédones et les monocotylédones (Chern et al., 2001), il est aisé de pronostiquer que de nombreuses expérimentations vont chercher à raffiner l'utilisation du gène *NPR1*.

Une autre priorité d'amélioration des plantes concerne la résistance aux stress abiotiques, afin de sécuriser voire d'augmenter les récoltes dans les zones de productions à risques.

Pour la tolérance aux basses températures et à la sécheresse, il semblait logique de chercher à préciser le rôle des facteurs de transcription appelés CBF/DREB (Cook et al, 2004). Les tentatives visant à sur-exprimer DREB1A dans les plantes conduisent effectivement à une meilleure résistance au gel, mais provoquent également de sévères retards de croissance chez les plantes transgéniques élevées à 20°C. Cependant, en contrôlant l'expression de DREB1A par une séquence promotrice de transcription (*rd29A*) elle même activée par un stress, il est possible de minimiser les effets sur la croissance tout en améliorant la tolérance au froid chez le tabac (Kasuga et al., 2004).

L'expression de DREB1A chez le riz, augmente la résistance à la pression osmotique et améliore légèrement la résistance au froid (Oh et al., 2005).

Les progrès des techniques d'analyse des voies de biosynthèse, la connaissance de leurs régulations permettent d'envisager leurs modifications ciblées, afin d'améliorer la composition nutritionnelle des produits végétaux (Galili et al., 2002). Il est désormais possible de cibler la suppression des substances toxiques ou allergènes telle l'allergène majeur des graines de soja la protéine P34 (Herman, 2005).

La modulation de l'activité des facteurs de transcription est également l'un des outils disponibles, qui peut d'ailleurs se révéler utile pour augmenter globalement des métabolismes

de base, ainsi par exemple de l'assimilation de l'azote par les plantes (Yanagisawa et al., 2004).

Les stratégies d'amélioration de la qualité nutritionnelle des organes de réserve sont toujours d'actualité et se diversifient. Pour les graines, l'augmentation de la teneur en β -carotène, pro-(vitamine A) par transgénèse chez le riz (doré) fournit un bon exemple de l'évolution rapide des techniques et des stratégies au cours des dernières années (Paine et al., 2005). La question de la qualité nutritive se pose de façon réellement cruciale pour les racines de manioc ou les tubercules de pomme de terre, qui renferment jusqu'à 90% d'amidon en matière sèche, mais dont la teneur en protéine dépasse rarement 1%.

Des tentatives assez prometteuses sont en cours d'évaluation sur des pommes de terre transgéniques qui expriment une protéine d'*Amaranthus* (Chakraborty et al., 2000) et sur des maniocs qui expriment un gène synthétique à base de zéine (Zhang et al., 2003). L'analyse des modalités d'expression des zéines chez le maïs, conduit au contrôle de l'expression d'une zéine riche en méthionine par le transfert de la séquence codante sous le contrôle d'un promoteur de transcription non cible d'un mécanisme d'extinction (empreinte parentale) (Lai et Messing, 2002). Un autre exemple dans le domaine des protéines de graines concerne l'expression d'une protéine synthétique la zeoline, chimère composée d'une phaseoline et d'un fragment de γ -zéine. La portion de zéine est suffisante pour induire la formation de corps protéiques, ce qui permet d'exprimer de façon importante une protéine stable (Maineri et al., 2004).

La capacité de transférer de grands fragments d'ADN ouvre également des voies entièrement nouvelles d'amélioration. Ainsi, le transfert des 90 kb d'un clone BAC comportant les 35 kb du cluster de dix gènes de α -kafirine du sorgho au maïs prouve que le transfert ciblé d'un cluster est possible. Mais révèle aussi et de façon plus surprenante que l'accumulation de α -kafirine ne perturbe pas la quantité de zéine (Song et al., 2004).

Enfin, la compréhension des processus du développement des plantes, qui progresse rapidement depuis quelques années, permet d'envisager de contrôler l'architecture des plantes afin de les adapter à tel ou tel type de productions (Sakamoto et al., 2004 ; Sakamoto et al., 2006), ainsi que d'agir sur la taille des graines, qui influe sur les capacités de stockage (Jokufu et al., 2005).

7 – Perspectives

Clairement, les progrès de la génomique et de la génétique sont en constante accélération depuis une dizaine d'années, et les techniques de transfert de gènes jouent un rôle majeur dans ces domaines, en inter-opérabilité avec les techniques d'analyses globales (transcriptomique, protéomique, métabolomique).

Les techniques de transfert de gènes, elles-mêmes en constante évolution, ont atteint un tel raffinement qu'il est désormais possible d'intervenir sur le génome d'une plante sans avoir à faire intervenir de séquences d'autre organismes (Rommens et al., 2004). La connaissance intime des différents mécanismes d'intégration, en cours d'étude (Li et al., 2005), devrait permettre à la fois d'améliorer la précision de l'intégration des transgènes et de définir les conditions de la recombinaison homologe.

Ces connaissances permettront ensuite, d'affiner plus avant les caractéristiques des agrobactéries (Gelvin, 2003).

Les agrobactéries recombinantes constituent déjà les vecteurs les plus utilisés pour transférer des gènes aux plantes. Cela, dans un large éventail d'utilisations, faisant parfois intervenir des séquences infectieuses complètes de virus de végétaux et souvent *in planta* (Marillonnet et al., 2005). En conséquence, il devient urgent de développer des vecteurs biologiquement confinés, qui complèteraient les mesures de confinement physique déjà mis en place pour ces organismes recombinants. L'une des caractéristiques qui devrait s'imposer de façon pratique

dans tous les laboratoires (puis de façon réglementaire), repose sur les mutations qui rendent les bactéries incapables de se développer dans les conditions naturelles. Ainsi de l'auxotrophie pour la cystéine dont on sait, de plus, qu'elle rend les bactéries plus efficaces pour le transfert de L'ADN-T (Collens et al., 2004).

Depuis une dizaine d'années, les progrès des connaissances, les premières applications agronomiques du transfert de gènes et les nombreuses expérimentations en cours, font émerger une vision de plus en plus claire de l'intérêt de cet instrument complémentaire pour de nombreux programmes d'amélioration des plantes. Les applications potentielles sont extrêmement variées, mais les dispositifs les plus avancés concernent l'amélioration des qualités nutritionnelles des productions végétales ainsi que la sécurisation de la production par une tolérance adaptée aux stress.

À l'opposé de ce que l'on entend souvent, ces applications offrent de réelles perspectives pour la sécurité des aliments et des possibilités d'agriculture plus durable.

Alors que l'entretien irraisonné de la peur « des consommateurs » s'est d'emblée focalisé sur les dangers biologiques nouveaux que feraient émerger ces techniques artificielles, il devient urgent de faire savoir que le transfert de gènes est le processus naturel qui constitue l'un des moteurs essentiels de l'évolution des formes de vie sur la terre ! Ce sont donc des événements de transferts innombrables, répétés et s'insérant au hasard, qui ont façonné les végétaux que nous connaissons aujourd'hui (Timmis et al., 2004).

Ces transferts naturels présentent les mêmes caractéristiques que ceux pratiqués en laboratoire, et se manifestent avec des fréquences élevées, par exemple de l'ordre de 1 pollen de tabac sur 16000 est porteur d'un segment d'ADN chloroplastique donc bactérien (Huang et al., 2004), le phénomène est identique chez le riz (Matsuo et al., 2005) et doit se manifester chez toutes les plantes.

Enfin, les processus de transferts naturels sont beaucoup plus efficaces, que ce que l'on cherche à reproduire au laboratoire. Nous l'avons déjà signalé, la transformation du génome des mitochondries des plantes n'est toujours pas maîtrisée expérimentalement, alors que l'analyse du génome des mitochondries d'un arbuste tropical, *Amborella trichopoda*, révèle que sur 45 gènes des mitochondries 26 proviennent d'autres plantes, dont une dizaine sont caractéristiques des mousses et des fougères, épiphytes sur les feuilles de l'arbuste ! (Bergthorsson et al., 2004).

Il faut donc trouver les moyens de vulgariser ces données sur les mécanismes naturels de l'évolution des végétaux. De sorte que le débat, sur l'utilisation pratique du transfert de gènes, puisse enfin mobiliser les réflexions sur l'un des aspects (quelque peu occulté jusqu'à présent), qui reste un pré-requis fondamental : celui de l'établissement d'un véritable code d'usage applicable au niveau mondial et de la technique et de la gestion des produits.

Bibliographie

Afobali AS, Worland B, Snape JW, Vain P. (2004) A large scale study of rice plants transformed with different T-DNAs provides new insights into locus composition and T-DNA linkage configurations. *Theor. Appl. Genet.* 109, 815-826.

Alonso JL, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R. (2003) Genome wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653-657.

- Aoki S, Takebe I. (1969) Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus ribonucleic acid. *Virology* 39, 439-441.
- Aziz N, Machray GC. (2003) Efficient male germ transformation for transgenic tobacco production without selection. *Plant Mol. Biol.* 23, 203-211.
- Bako L, Umeda M, Tiburcio AF, Schell J, Koncz C. (2003) The VirD2 pilot protein of *Agrobacterium*-transferred DNA interacts with the TATA box-binding protein and a nuclear protein kinase in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 10108-10113.
- Barton KA, Binns AN, Matze AJM, Chilton MD. (1983) Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA and transmission of T-DNA to R1 progeny. *Cell* 32, 1033-1043.
- Bechtold N, Ellis J, Pelletier G. (1993) *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Acad. Sci. III Vie* 316, 1194-1199.
- Bechtold N, Jaudeau B, Jolivet S, Maba B, Vezon D, Voisin R, Pelletier G. (2000) The maternal chromosome set is the target of the T-DNA in the *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 155, 1875-1887.
- Bergthorsson U, Richardson AO, Young GJ, Goertzen LR, Palmer JD. (2004) Massive horizontal transfer of mitochondrial genes from diverse land plant donors to the basal angiosperm *Amborella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 17747-17752.
- Bouchez D, et Höfte H. (1998) Functionnal genomics in plants. *Plant Physiol.* 118, 725-732.
- Boynton JE, Gillham NW. (1996) Genetics and transformation of mitochondria in the green alga *Chlamydomonas*. *Methods Enzymol.* 264, 279-296.
- Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, et al. (1988) Chloroplasts transformation in *Chlamydomonas* with high velocity micro-projectiles. *Sciences*, 240, 1534-1538.
- Brandizzi F, Fricker M, Hawwes C. (2002) A greener world : the revolution in plant bioimaging. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3, 520-530.
- Braun AC. (1947) Thermal studies on the factors responsible for tumor induction in crown-gall. *Am. J. Bot.* 34, 234-240.
- Browse J, Sommerville C. (1991) Glycerolipids synthesis, biochemistry and regulation. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.* 42, 467-506.
- Bundock P, Hooykaas PJJ. (1996) Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 14, 3206-3214.
- Caboche M, Deshayes A. (1985) Utilisation de liposomes pour transformation de protoplastes de mésophylle de tabac par un plasmide de *E. coli* leur conférant la résistance à la kanamycine. *CR Acad. Sci. Paris* 299, 663-666.
- Cao MX, Huang JQ, Wei ZM, Yao QH, Wan CZ, Lu JA. (2004) Engineering yield and herbicide resistance in rice by *Agrobacterium* mediated multiple gene transformation. *Crop Sci.* 44, 2206-2213.
- Carpenter JE (2001) Case studies in benefits and risks of agricultural biotechnology : Round-up ready soybeans and Bt field corn. Report of the National Center for Food and Agricultural Policy, Washington DC, USA; 54 pp.
- Chakraborty S, Chakraborty N, Datta A. (2000) Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a non allergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3724-3729.
- Chern MS, Fitzgerald HA, Yadav RC, Canlas PE, Dong X, Ronald PC. (2001) Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the *NPR1* mediated signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* 27, 101-113.

- Chupeau MC, Bellini C, Guerche P, Maisonneuve B, Vastra G, Chupeau Y (1989) Transgenic plants of lettuce (*Lactuca sativa*) obtained through electroporation of protoplasts. *Nature Biotechnol.* 7, 503-507.
- Clough SJ, Bent AF. (1998) Floral dip : a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16,735-743.
- Cocking EC. (1960) A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, 187, 927-929.
- Cohen SN, Miller CA. (1970) Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria. II Molecular nature of R-factor isolated from *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 50, 671-687.
- Collens JI, Lee DAE, Seeman AM, Curtis WR. (2004) Development of auxotrophic *Agrobacterium tumefaciens* for gene transfer in plant tissue culture. *Biotechnol. Prog.* 20, 890-896.
- Cook D, Fowler S, Fiehn O, Thomashow F. (2004) A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low temperature metabolome of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 1543-1548.
- Corneille S, Lutz KA, Azhagiri AK, Maliga P. (2003) Identification of a functional *Lox* site in the plastid genome. *Plant J.* 35, 753-762.
- Curtis IS. (2005) Production of transgenic crops by the floral dip method. *Methods Mol. Biol.* 286, 103-110.
- Dale EC, Ow DW. (1991) Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 23, 10558-10562.
- Davey MR, Anthony P, Power JB, Lowe KC. (2005) Plant protoplasts : status and biotechnological perspectives. *Biotechnol. Adv.* 23, 131-171.
- D'Erfurth I, Cosson V, Eschtruth A, Lucas H, Kondorosi A, Ratet P. (2003) Efficient transposition of the Tnt1 tobacco transposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.*, 33,1-12.
- D'Halluin K, Bonne E, Bossut M, De Beuckeller M, Leemans J. (1992) Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell* 4, 1495-1505.
- De Block M, Schell J, Van Montagu M. (1985) Chloroplast transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.*, 4, 1367-1372.
- De Frammond AJ, Barton KA, Chilton MD. (1983) Mini-Ti : a new vector strategy for plant genetic engineering. *Nature Biotechnol.* 5, 262-269.
- De Groot MJA, Bundock P, Hooykaas PJJ, Beijersbergen AGM. (1998) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnol.* 16, 839-842.
- De Vetten N, Wolters AM, Raemakers K, van der Meer I, ter Stege R, Heeres E, Heeres P, Visser R. (2003) A transformation method for obtaining marker free plants of cross pollinating and vegetatively propagated crop. *Nature Biotechnol.* 21, 439-442.
- Delseny M, Salse J, Cooke R, Salaud C, Regad F, Lagoda P, Guiderdoni E, Ventelon M, Brugidu C, Ghesquière A. (2001) Rice genomics : present and future. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 323-334.
- Feldmann KA, Marks MD. (1987) *Agrobacterium* mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana* : a non tissue culture approach. *Mol. Gen. Genet.* 208, 1-9.
- Fraley R, Straubinger RM, Springer EL, Papahadjopoulos D. (1981) Liposome mediated delivery of deoxyribonucleic acid to cells enhanced efficiency of delivery related to lipid composition and incubation conditions. *Biochemistry* 24, 6978-6987.
- Friesner J, Britt AB. (2003) Ku80- and DNA ligase IV-deficient plants are sensitive to ionizing radiation and defective in T-DNA integration. *Plant J.* 34, 427-440.
- Fromm ME, Taylor LP, Walbot V. (1986) Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* 319, 791-793.
- Gallego ME, Bleuyard JY, Daoudaql-Cotterell N, White CI. (2003) Ku80 plays a role in non-homologous recombination but is not required for T-DNA integration in *Arabidopsis*. *Plant J.* 35, 557-565.

- Galili G, Lewinsohn E, Tadmor Y. (2002) Genetic, molecular and genomic approaches to improve the value of plant feeds and foods. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 167-204.
- Gelvin SB. (2003) *Agrobacterium* mediated plant transformation : the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 16-37.
- Golds T, Maliga P, Koop HU. (1993) Stable plastid transformation in PEG treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Nature Biotechnol.* 11, 95-97.
- Gonsalves D. (1998) Control of papaya ringspot virus in papaya : a case study. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 415-437.
- Hammond-Kosac KE, Parker J. (2005) Deciphering plant-pathogen communication : fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 177-193.
- Hellens R, Molineaux P, Klee H. (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci.* 5, 446-451.
- Herman E. (2005) Soybean allergenicity and suppression of the immunodominant allergen. *Crop Sci.* 45, 462-467.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6, 271-282.
- Herrera-Estrella L, Depicker A, Van Montagu M, Schell J. (1983) Expression of chimeric genes transferred into plants cells using a Ti plasmid-derived-vector. *Nature* 303, 209-213.
- Hilson P et al. (2004) Versatile gene-specific sequence tags for *Arabidopsis* functional genomics : transcript profiling and reverse genetics applications. *Genome Research*, 14, 2176-2189.
- Hirschberg J. (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, 210-218.
- Hoekema A, Hirsh PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir* and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303, 179-180.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.
- Huang J, Hu R, Rozelle S, Pray C. (2005) Insect-resistant rice in farmers' fields : assessing productivity and health effects in China. *Science* 308, 688-690.
- Huang CY, Ayliffe MA, Timmis JN. (2004) Simple and complex nuclear loci created by newly transferred chloroplast DNA in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 9710-9715.
- Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T. (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol.* 14, 745-750.
- Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J, Petresen SG, Brundstedt J, Okkels FT. (1998) Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol. Breed.* 4, 111-117.
- Johnston SA. (1990) Biolistic transformation : microbes to mice. *Nature* 346, 776-777.
- Johnston SA, Anziano PQ, Shark K, Sanford JC, Butow RA. (1988) Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science* 240, 1538-1541.
- Jokufu KD, Omidyar PM, Gee Z, Okamura JK. (2005) Control of seed mass and yield by the floral homeotic gene *APETALA2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 3117-3122.
- Kao KN, Michayluk MR. (1974) A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* 115, 355-367.
- Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2004) A combination of the *Arabidopsis* *DREB1A* and *rd29A* promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol.* 45, 346-350.

- Komari T, Hiei SY, Murai N, Kumashiro T. (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.* 10, 165-174.
- Kunik T, Tzfira T, Kapulnik Y, Gafni Y, Dingwall C, Citovsky V. (2001) Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1871-1876.
- Langbecker CL, Ye GN, Broyles DL, Duggan LL, Xu CW, Hajdukiewicz PTC, Armstrong CL, Staub JM. (2004) High frequency transformation of undeveloped plastids in tobacco suspension cells. *Plant Physiol.* 135, 39-46.
- Lai J, et Messing J. (2002) Increasing maize seed methionine by mRNA stability. *Plant J.*, 30, 395-402.
- Ledoux L, Huart R, Jacobs M. (1974) DNA mediated genetic correction of thiamineless *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 249, 17-21.
- Lentz BR, Lee JK. (1999) Poly(ethyleneglycol) (PEG)-mediated fusion between pure lipid bilayers : a mechanism in common with viral fusion and secretory vesicle release? *Mol. Membr. Biol.* 16, 279-296.
- Levy YY, Dean C. (2005) The transition to flowering. *Plant Cell* 10, 1973-1989.
- Li J, Vaidya M, White C, Vainstein A, Citovski V, Tzfira T. (2005) Involvement of ku80 in T-DNA integration in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 19231-19236.
- Lida S, Terada R. (2004) A tale of two integrations, transgene and T-DNA: gene targeting by homologous recombination in rice. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 132-138.
- Lin WC, Lu CF, Wu JW, Cheng ML, Lin YM, Yang NS, Black L, Green SK, Wang JF, Cheng CP. (2004) Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis NPR1* gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic Res.* 13, 567-581.
- Lloyd AM, Walbot V, Davis RW. (1992) *Arabidopsis* and *Nicotiana* anthocyanin production activated by maize regulators R and C1. *Science* 258, 1773-1775.
- Maineri D, Rossi M, Archinti M, Belluci M, De Marchis F, Vavassori S, Pompa A, Arcioni S, Vitale A. (2004) Zeolin. A new recombinant protein constructed using maize γ -zein and bean phaseolin. *Plant Physiol.* 136, 3447-3456.
- Maliga P. (2004) Plastid transformation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55, 289-3313.
- Mallory AC, Vaucheret H. (2004) MicroRNA : something important between the genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 120-125.
- Marrillonet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y. (2005) systemic *Agrobacterium tumefaciens* mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnol.* 23, 718-723.
- Matsuo M, Ito Y, Yamauchi R, Obokata J. (2005) The rice nuclear genome continuously integrates, shuffles and eliminates the chloroplast genome to cause chloroplast-nuclear DNA flux. *Plant Cell* 17, 665-675.
- Mendelsohn M, Kough J, Matthews K. (2003) Are Bt crops safe ? *Nature Biotechnol.* 21, 1003-1009.
- Mentewab A, Stewart CN. (2005) Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* ABC transporter confers kanamycin resistance to transgenic plants. *Nature Biotechnol.* 23 , 1177-1180.
- Morikawa H, Yamada Y. (1985) Capillary micro-injection into protoplasts and intranuclear localization of injected materials. *Plant Cell Physiol.* 26, 229-236.
- Nishal B, Tantikanjana T, Sundaresan V. (2005) An inducible targeted tagging system for localized saturation mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137, 3-12.
- Nitsch JP, Ohyama K. (1971) Obtention de plantes à partir de protoplastes cultivés in vitro. *CR Acad. Sci. Paris*, 273, 801-804.

- Oh SJ, Song SI, Kim YS, Jang HJ, Kim SY, Kim M, Kim YK, Nahm BH, Kim JK. (2005) *Arabidopsis* CFB3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. ***Plant Physiol.*** 138, 341-351.
- Ohyama K, Gamborg OI, Miller RA. (1972) Uptake of exogenous DNA by plant protoplasts. ***Can. J. Bot.*** 50, 2077-2080.
- Orzaez D, Mirabel S, Wieland WH, Granell A. (2006) Agroinfection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. ***Plant Physiol.*** 140, 3-11.
- Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, Howells RH, Kennedy MJ, Vernon G, Wright SY, Hindchiffé E, Adams JL, Silverstone AL, Drake R. (2005) Improving the nutritional value of golden rice through increased pro-vitamin A content. ***Nature Biotechnol.*** 23, 482-487.
- Paszkowski J, Shillito RD, Saul M, Mandák V, Hohn B, Potrykus I. (1984) Direct gene transfer to plants. ***EMBO J.*** 3, 2717-2722.
- Petit A, Tourneur J. (1972) Perte de virulence associée à la perte d'une activité enzymatique chez *Agrobacterium tumefaciens*. ***CR Acad. Sci. Paris*** 275, 137-139.
- Potrykus I. (1990) Gene transfer to plants : assessment and perspectives. ***Physiol. Plant.*** 79, 125-134.
- Puchta H. (2003) Marker free transgenic plants. ***Plant Cell Tissue Org. Cult.*** 74, 123-134.
- Rommens CM, Humara JM, Ye J, Yan H, Richael C, Zhang L, Perry R, Swords K. (2004) Crop improvement through modification of the plant's own genome. ***Plant Physiol.*** 135, 421-431.
- Sakamoto T, Morinaka Y, Ohnishi T, Sunohara H, Fujioka S, Ueguchi-Tanaka M, Mizutani M, Sakata S, Takatsuto S, Yoshida S, Tanaka H, Kitano H, Matsuoka M. (2006) Erect leaves caused by brassinosteroid deficiency increase biomass production and grain yield in rice. ***Nature Biotechnol.*** 24, 105-109.
- Sakamoto T, Matsuoka M. (2004) Generating high yielding varieties by genetic manipulation of plant architecture. ***Curr. Opin. Biotechnol.*** 15, 144-147.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. Vols. 1, 2, 3.
- Sanford JC. (1988) The biolistic process. ***Trends Biotechnol.*** 6, 299-302.
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kazuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K. (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. ***Plant Cell*** 13, 61-72.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp.* red fluorescent protein. ***Nature Biotechnol.*** 22, 1567-1572.
- Sheen J. (2001) Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. ***Plant Physiol.*** 127, 1466-1475.
- Shibata D, Liu YC. (2000) *Agrobacterium* mediated plant transformation with large DNA fragments. ***Trends Plant Sci.*** 5, 354-357.
- Smith EF, Townsend CO. (1907) A plant tumor of bacterial origin. ***Science*** 25, 671-673.
- Somers DA, Makarevitch I. (2004) Transgene integration in plants : poking or patching holes in promiscuous genomes? ***Current Opin. Biotech.*** 15, 126-131.
- Song J, Bradeen JM, Naess SK, Raasch JA, Wielgus SM, Haberlach GT, Liu J, Kuang H, Austin-Phillips S, Buell CR, Helgeson JP, Jiang J. (2003) Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA*** 100, 9128-9133.
- Song R, Segal G, Messing J. (2004) Expression of the sorghum 10-members kafirin gene cluster in maize endosperm. ***Nucleic Acids Res.*** 32, e189.

- Srivastava V, Ow DW. (2004) Marker-free site specific gene integration in plants. *Trends Biotech.* 22, 627-629.
- Stuitje AR, Verbree EC, van der Linden KH, Mietkiewska EM, Nap JP, Kneppers TJA. (2003) Seed-expressed fluorescent proteins as versatile tools for easy (co)transformation and high throughput functional genomics in *Arabidopsis*. *Plant Biotech J.* 1, 301-309.
- Svab Z, Hadjukiewicz P, Maliga P. (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 8526-8530.
- Taylor NJ, Fauquet CM. (2002) Microparticule bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA Cell Biol.* 21, 936-977.
- The AGI : *Arabidopsis* Genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.
- Timmis JN, Ayliffe MA, Huang CY, Martin W. (2004) Endosymbiotic gene transfer : organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Rev. Genet.*, 5, 123-135.
- Tinland B. (1996) The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci.* 1, 178-184.
- Tzfira T, Frankman LR, Vaidya M, Citovsky V. (2003) Specific site integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA via double stranded intermediates. *Plant Physiol.* 133, 1011-1023.
- Van der Fits L, Deakin EA, Hoge JH, Memelink J. (2000) The ternary transformation system : constitutive *virG* on a compatible plasmid dramatically increases *Agrobacterium* mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 43, 495-502.
- Van Larebeke N, Genetello C, Schell J, Schilperoort RA, Hermans AK, Hernalsteens JP, Van Montagu M. (1975) Acquisition of tumor inducing ability of non oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. *Nature* 255, 742-743.
- Vinocur B, Altman A. (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress : achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 123-132.
- Vinkel-Shirley B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol*, 126, 485-493.
- Wallin A, Glimelius K, Eriksson T. (1974) The induction of aggregation and fusion of *Daucus carota* protoplasts by polyethylene glycol. *Z. Pflanzenphysiol.* 74, 64-80.
- Xuc H, Yang YT, Wu Zhang MM, Zheng CC. (2005) TM2 a novel strong matrix attachment region isolated from tobacco, increases transgene expression in transgenic rice calli and plants. *Theor. Applied Genet.* 110, 620-627.
- Yanagisawa S, Akyiama A, Kisasa H, Uchimiya H, Miwa T. (2004) Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants : improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7833-7838.
- Yoshioka, Y, Takahashi Y, Matsuoka K, Nakamura K, Koizumi J, Kojima M, Machida M. (1996) Transient gene expression in plant cells mediated by *Agrobacterium tumefaciens* : application for the analysis of virulence loci. *Plant Cell Physiol.* 37, 782-789.
- Yuan Q, Ouyang S, Liu J, Suh B, Cheung F, Sultana R, Lee D, Quackenbush J, Buell CR. (2003) The TIGR rice genome annotation resource : annotating the rice genome and creating resources for plant biologists. *Nucleic Acids Res.* 31, 229-233.
- Zhang P, Jaynes JM, Potrykus I, Grisse W, Puonti-Kaerlas J. (2003) Transfer and expression of an artificial storage protein (ASP1) gene in cassava (*Manihot esculenta Crantz*). *Transgenic Res.* 12, 243-250.
- Zhou GY, Weng J, Zeng Y et al. (1983) Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. *Methods in Enzymology*, 101, 433-481.

Zupan J, Muth TR, Draper O, Zambryski P. (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants : a feast of fundamental insights. *Plant J.* 23, 11-28.