

---

## FICHE NOUVELLES TECHNIQUES

### AGROINFILTRATION

(AGROINFILTRATION *STRICTO SENSU* ET AGROINOCULATION)

---

#### Présentation générale de la technique (Grand public)

*Agrobacterium tumefaciens* est une bactérie classiquement utilisée en biotechnologies comme vecteur de transfert de matériel génétique dans le génome d'une plante. La bactérie est génétiquement modifiée (recombinante) afin de porter le gène d'intérêt, puis est mise en contact avec des cellules de plante dans lesquelles elle transfère le gène (transgène). Il est ensuite possible d'obtenir une plante génétiquement modifiée à partir de ces cellules (voir fiche Transgénèse classique).

Cette bactérie peut aussi être utilisée avec un autre objectif : l'agroinfiltration. Dans ce cas, les bactéries recombinantes sont mises en contact, selon divers procédés, avec les cellules de tissus d'une plante (généralement les feuilles). Après infection des tissus, les cellules végétales expriment transitoirement le ou les gènes d'intérêts. En pratique, cette technique est utilisée dans un objectif de production de protéines ou de molécules d'intérêt. Celles-ci sont le plus souvent purifiées après récolte et broyage des tissus de la plante. Cette technique permet aussi l'étude de la fonction de gènes inconnus.

Cette fiche traite de :

l'agroinfiltration *stricto sensu*, effectuée dans des tissus somatiques (composés de cellules incapables de reproduction, typiquement des feuilles) avec un matériel génétique sans capacité de multiplication, dans le but d'obtenir une expression transitoire.

L'agroinfection ou agroinoculation, effectuée dans des tissus somatiques avec un matériel répliatif (gène d'intérêt contenu dans un génome viral entier), dans le but d'obtenir une expression transitoire dans la plante entière.

La technique appelée « floral dip », par laquelle des fleurs ou des inflorescences sont agroinfiltrées, dans le but d'obtenir la transformation stable de quelques embryons, qui seront sélectionnées après germination, n'est pas abordée ici, son statut de production d'OGM étant clairement établi.

La libération d'une agrobactérie génétiquement modifiée dans l'environnement entre, de fait, dans le cadre de la directive 2001/18/CE (EC, 2001). La question réglementaire posée par la commission européenne ne concerne donc que les plantes et leurs produits, obtenus par cette technique en milieu confiné. Dans cet avis l'agro-infiltration n'est donc envisagée qu'en milieu confiné bien que des mises au point soient en cours pour une éventuelle utilisation en champs (Chen and Lai, 2015). Dans l'hypothèse d'un développement de cette approche en plein champ, une évaluation complète au titre de la directive 2001/18/CE devra être réalisée.

## Principe et fonctionnement au niveau cellulaire et moléculaire

L'agroinfiltration *stricto sensu* est une technique impliquant l'utilisation comme vecteur de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* introduit de manière mécanique, *in vivo* ou *ex vivo*, dans un tissu végétal, et aboutissant à l'expression transitoire d'un ou plusieurs gènes d'intérêt dans les cellules végétales agroinfiltrées.

Techniquement, l'agroinfiltration consiste en l'introduction intratissulaire, à l'aide d'une seringue, d'une suspension d'agrobactéries comportant un plasmide « désarmé<sup>1</sup> » sur lequel se trouvent les gènes d'intérêt à transmettre, dans les feuilles d'une plante (figure 1). La plante la plus utilisée est le tabac (*Nicotiana benthamiana*). Une alternative est l'utilisation d'une pompe à vide pour infiltrer la suspension bactérienne dans les tissus végétaux (figure 2). La combinaison de ces deux méthodes peut également être utilisée.



**Figure 1** : Agroinfiltration de feuilles de *Nicotiana benthamiana* avec *Agrobacterium tumefaciens*, à l'aide d'une seringue. Les agrobactéries portant les gènes d'intérêts sont en suspension dans un tampon d'infiltration. Une blessure est faite sur la face inférieure des feuilles (A). Les agrobactéries sont ensuite infiltrées dans l'espace interstitiel de la feuille à l'aide de la seringue, à l'endroit de la blessure (B et C) (Leuzinger et al., 2013).

<sup>1</sup> Le Plasmide Ti est naturellement présent dans la bactérie et comporte des gènes de virulence responsables de la pathogénicité de la bactérie. Ici, la forme désarmée correspond à un plasmide dépourvu des gènes de synthèse de phytohormones.



**Figure 2 :** Infiltration sous vide de feuilles de tabac avec *Agrobacterium tumefaciens*. Les agrobactéries portant les gènes d'intérêts sont en suspension dans un tampon d'infiltration déposé dans une cuve. Cette dernière est ensuite placée dans un dessiccateur, lui-même connecté à une pompe à vide (A). Un plant de tabac (de 6 semaines) est placé dans dessiccateur (B), de façon à ce que le système foliaire soit immergé dans la suspension bactérienne (C). L'agroinfiltration est obtenue en appliquant le vide dans le dessiccateur (Leuzinger et al., 2013).

Une fois infiltrées, les agrobactéries se trouvent dans l'espace intercellulaire, elles n'entrent pas dans les cellules végétales. Une ou plusieurs copies de l'ADN-T (ADN de transfert) sont transférées dans les cellules végétales de la zone injectée. Ces ADN-T sont utilisés comme matrice de transcription par la machinerie cellulaire, les ARN produits sont traduits en protéines. L'ADN-T n'est pas nécessairement répliqué, ni intégré dans le génome de la cellule.

L'intégration de l'ADN-T dans le génome des cellules végétales est rare, mais peut néanmoins se produire dans quelques cellules de la zone agroinfiltrée (Jia et al., 2007). Cependant, le but de l'agroinfiltration *stricto sensu* n'est absolument pas de régénérer une plante entière à partir de ces cellules génétiquement modifiées qui seront détruites en fin d'opération.

Généralement, l'expression est limitée à la zone injectée ; en effet, les agrobactéries restent localisées dans la zone infiltrée, où elles peuvent se multiplier si les conditions sont favorables. Des mouvements de bactéries vers des zones non infiltrées et notamment vers des organes de reproduction (avec contamination potentielle de graines) sont concevables mais restent très peu probables. L'intégration de l'ADN-T dans le génome de cellules germinales est donc théoriquement possible mais très improbable. Cependant, les données pour évaluer rigoureusement la fréquence de ces événements sont manquantes. L'utilisation de cette technique sur des plantes entièrement broyées, récoltées avant floraison, permet d'éviter le risque de transmission.

Dans le cas de l'agroinfection ou agroinoculation, en conditions *in vivo*, l'ADN-T peut contenir un matériel répliquatif (génome viral entier) dans le but d'obtenir une expression en dehors de la zone agroinfiltrée, voire dans toute la plante.

## Utilisations possibles

Cette technique est utilisée :

- à des fins de production de protéines ou de molécules d'intérêt (Fischer et al., 2012 ; Rybicki, 2014) ;
- en recherche fondamentale :
  - o pour étudier les interactions plante-pathogène, en clonant notamment des génomes entiers de virus ou des réplicons dans l'ADN-T ;

- pour sélectionner des plantes résistantes ou tolérantes à un pathogène, avec une potentielle application dans des programmes de sélection variétale (agroinfiltration avec des gènes spécifiques de pathogènes, ou l'effet sur le phénotype de la plante et la résistance/tolérance sont évalués) ;
- pour analyser la fonction de gènes encore inconnus (notamment par extinction de gène induite par virus / Virus-Induced Gene Silencing (VIGS), ou par interférence) ;
- Pour tester la fonctionnalité d'une construction génique.

## Modalités de mise en œuvre

L'agro-infiltration est un procédé consistant à infecter une plante non génétiquement modifiée avec une agrobactérie génétiquement transformée. La partie OGM est donc principalement la bactérie transformée qui serait soumise, en cas d'utilisation hors confinement, à autorisation au titre de la directive 2001/18/CE. Les plantes infectées, pourraient alors dans certains cas présenter une insertion stable du transgène de la bactérie dans leurs cellules et parfois même dans des cellules germinales. Leur descendance serait alors considérée comme OGM et devrait faire elle aussi l'objet d'une autorisation dans le cadre de la directive 2001/18/CE.

Cependant à l'heure actuelle l'agro-infiltration est réalisée en confinement (serre, laboratoire, fermenteur, ...) compte-tenu des exigences techniques et réglementaires. Dans ce contexte, du fait de l'utilisation d'une bactérie génétiquement modifiée, une autorisation dans le cadre de la directive 2009/41/CE est nécessaire afin de mettre en place toutes les mesures de confinement nécessaire à empêcher que les bactéries génétiquement modifiées se retrouvent en contact avec l'environnement.

## Avantages et contraintes par rapport aux techniques existantes

L'agroinfiltration est une approche rapide pour l'expression transitoire de gènes dans les plantes. Les avantages de l'agroinfiltration, par rapport à la transgénèse classique, sont la facilité de mise en œuvre de l'expérimentation, la rapidité de l'expression des gènes étudiés et le haut niveau d'expression atteint.

## Détection

### **La modification est-elle détectable dans les plantes porteuses de la modification et leurs produits ?**

Il est possible de détecter l'agrobactérie transformée présente sur les plantes ainsi que les cellules de plantes où le transgène serait présent (transitoirement ou de manière stable). Le produit de cette plante est généralement une protéine ou une molécule d'intérêt, la plante n'est pas conservée et une étape d'extraction est obligatoire. Il n'est pas toujours possible d'identifier l'origine du produit puisqu'il ne subsistera pas nécessairement de traces d'ADN dans celui-ci

## **Peut-on identifier la modification et la technique ayant donné lieu à la cette modification dans la plante porteuse de la modification et ses produits ?**

Les plantes utilisées en agroinfiltration sont identifiables par la présence abondante d'agrobactéries génétiquement modifiées à leur surface. Les produits devront être cependant être exempts de ces bactéries afin de sortir de confinement. L'origine d'un produit ne sera pas nécessairement imputable à l'utilisation d'agroinfiltration. Les modifications de glycosylation (Lerouge et al., 1998; Liénard et al., 2007) pourront éventuellement informer sur l'origine végétale des protéines produites sans toutefois permettre de connaître la technique utilisée.

## **Si une détection est possible, est-elle applicable dans le cadre d'une recherche de présence fortuite en situation de mélange plus ou moins complexe au cours du processus de production, de transformation et de distribution ?**

De la même manière les modifications de glycosylation pourront éventuellement informer sur l'origine végétale des protéines produites sans toutefois permettre de connaître la technique utilisée.

## **Bibliographie**

- Bhaskar, P.B., Venkateshwaran, M., Wu, L., Ané, J.M., Jiang, J. (2009). Agrobacterium-mediated transient gene expression and silencing : A rapid tool for functional gene assay potato. PLoS ONE. 4(6) : 1.
- Chen, Q., Lai, H., Hurtado, J., Stahnke, J., Leuzinger, K., Dent, M. (2014). Agroinfiltration as an effective and scalable strategy of gene delivery for production of pharmaceutical proteins. Adv Tech Biol Med. ; 1(1).
- Chen, Q., and Lai, H. (2015). Gene Delivery into Plant Cells for Recombinant Protein Production. BioMed Res. Int. 2015, 1–10.
- Du, J., Rietman, H., Vleeshouwers, V.G.A.A. (2014). Agroinfiltration and PVX agroinfection in potato and Nicotiana benthamiana. J. Vis. Exp. (83).
- EC (2001). Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. Off. J. Eur. Communities L106, 1–36.
- Fischer, R., Schillberg, S., Hellwig, S., Twyman, R.M., Drossard, J. (2012). GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. Biotechnol Adv. 30(2): 434-439.
- Gómez, E., Lucero, M.S., Chimeno Zoth, S., Carballeda, J.M., Gravisaco, M.J., Berinstein, A. (2013). Transient expression of VP2 in Nicotiana benthamiana and its use as a plant-based vaccine against infectious bursal disease virus. Vaccine. 31(23):2623-7.

- Jia, H., Liao, M., Verbelen, J.P., Vissenberg, K. (2007). Direct creation of marker-free tobacco plants from agroinfiltrated leaf discs. *Plant cell report*. 26 (11) : 1961-1965
- Leckie, B.M. and Stewart C Jr., N. (2011). Agroinfiltration as a technique for rapid assays for evaluating candidate insect resistance transgenes in plants. *Plant Cell Rep*. 30(3): 325-334.
- Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Lainé, A.C., Gomord, V., and Faye, L. (1998). N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol. Biol*. 38, 31–48.
- Leuzinger, K. Dent M, Hurtado J, Stahnke J, Lai H, Zhou X, Chen Q. (2013). Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. *J. Vis. Exp* (77).
- Liénard, D., Sourrouille, C., Gomord, V., and Faye, L. (2007). Pharming and transgenic plants. In *Biotechnology Annual Review*, (Elsevier), pp. 115–147.
- Panwar, V., McCallum, B., Bakkeren, G. (2015). A functional genomics method for assaying gene function in phytopathogenic fungi through host-induced gene silencing mediated by agroinfiltration. *Methods Mol Biol*. 1287:179-89.
- Rybicki, E.P. (2014). Plant based vaccines against viruses. *Virology Journal*.(11) :205.
- Von Lanken, C. and Hunt, A.G. (2015). Transient expression using agroinfiltration to study polyadenylation in plants. *Methods Mol Biol*. 1255 :127-133.