



Reprinted from

74

**Canadian
Journal of
Microbiology**

Réimpression du

**Journal
canadien
de
microbiologie**

**Un ARN extrait d'*Agrobacterium tumefaciens*,
souches oncogènes et non oncogènes, élément
indispensable à l'induction des tumeurs
chez *Datura stramonium***

L. LE GOFF, M. I. AARON-DA CUNHA, ET M. BELJANSKI

Volume 22 • Number 5 • 1976

Pages 694-701



National Research
Council Canada

Conseil national
de recherches Canada

Un ARN extrait d'*Agrobacterium tumefaciens*, souches oncogènes et non oncogènes, élément indispensable à l'induction des tumeurs chez *Datura stramonium*¹

L. LE GOFF ET M. I. AARON-DA CUNHA

Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire d'Ontogénèse Expérimentale, Tour 53, 4 Place Jussieu, 75230 Paris Cedex 05

ET

M. BELJANSKI

Institut Pasteur, Service de Biochimie Cellulaire, 28 rue du Docteur Roux, 75015 Paris

Approuvé le 23 janvier 1976

LE GOFF, L., M. I. AARON-DA CUNHA et M. BELJANSKI. 1976. Un ARN extrait d'*Agrobacterium tumefaciens*, souches oncogènes et non oncogènes, élément indispensable à l'induction des tumeurs chez *Datura stramonium*. *Can. J. Microbiol.* 22: 694-701.

Les résultats présentés montrent que l'ARN infectieux isolé des bactéries de souches oncogènes et non oncogènes est l'un des éléments absolument nécessaires de la participation d'*Agrobacterium tumefaciens* à l'obtention de la tumeur du collet (crown-gall). La présence de substances de croissance est également indispensable. Les bactéries des diverses souches non oncogènes que nous avons étudiées (en particulier 5 Gly, A₁₁₅ et antérieurement B₆-TR1) bien qu'incapables d'induire des tumeurs de prolifération illimitée dans les conditions habituelles d'inoculation possèdent cependant cet ARN tumorigène que l'on peut extraire et dont le caractère oncogène a été démontré.

LE GOFF, L., M. I. AARON-DA CUNHA, and M. BELJANSKI. 1976. Un ARN extrait d'*Agrobacterium tumefaciens*, souches oncogènes et non oncogènes, élément indispensable à l'induction des tumeurs chez *Datura stramonium*. *Can. J. Microbiol.* 22: 694-701.

An RNA bound to the reverse transcriptase of *Agrobacterium tumefaciens* has been isolated and shown to be oncogenic for stem tissues of *Datura stramonium* grown under axenic conditions. The tumorous nature of the cellular change induced by the infectious RNA was demonstrated by serial grafts of tumors on *Datura* stems and by cultivation of tumorous tissue in vitro on a medium without supplemental auxins and cytokinins. Active cellular proliferation within tissues of *Datura* stems was a prerequisite for expression of the oncogenic potential of the RNA. Further, infectious RNA was isolated from avirulent and attenuated strains of *Agrobacterium tumefaciens* including attenuated derivatives of strain AC₅₃ which have been "heat-cured" of the plasmid associated with virulence. It is proposed that the infectious RNA is an essential but not the sole component of the tumor-inducing mechanism of the crown-gall bacterium.

Introduction

Agrobacterium tumefaciens est la seule espèce bactérienne qui possède la capacité d'induire une tumeur chez les plantes (crown-gall) (34). Cette bactérie agit sur la cellule végétale par l'intermédiaire d'un principe inducteur (10) qui serait efficace en présence de plusieurs éléments différents, la nature de certains restant à préciser.

Parmi les très nombreuses souches d'*Agrobacterium* utilisées, certaines sont dites atténuées car inoculées à des pois en germination, elles conduisent à l'apparition de cals de prolifération limitée. On sait cependant que les bactéries atténuées A₆₆ inoculées en présence d'une source exogène d'auxine sont capables de donner des

tumeurs qui échappent définitivement aux mécanismes de régulation de croissance (9). D'autres sont qualifiées d'avirulentes; la structure de leur membrane peut être altérée mais on sait par exemple que les modifications de la structure de la paroi imputables à "l'action des acides aminés" sont sans rapport direct avec l'expression du pouvoir oncogène de ces bactéries (24).

Le fait que la cancérisation donne aux cellules végétales induites des propriétés nouvelles et permanentes a conduit à émettre l'hypothèse que des informations génétiques ou épigénétiques en provenance de la bactérie pouvaient être contenues dans les acides nucléiques.

Il a été montré depuis longtemps que des préparations d'ADN provenant des bactéries oncogènes *A. tumefaciens* induisent, par inocu-

¹Reçu le 16 juin 1975.

lation à des plantes sensibles, des excroissances dont le caractère tumoral n'a pas été toujours mis en évidence (7, 14, 17, 18, 25, 26, 32, 33, 35, 39). Dans un cas cependant (5) les proliférations obtenues après inoculation de préparations d'"acides nucléiques totaux" semblent répondre aux critères d'identification d'une cancérisation.

Une corrélation entre la présence de plasmides et le caractère "virulence" de différentes souches d'*A. tumefaciens* a été établie (38, 40). Cependant, aucune démonstration mettant en évidence le rôle primordial de l'ADN du plasmide dans la tumorigénèse n'a été apportée.

La transformation des cellules végétales conditionnées en cellules tumorales semble exiger la participation d'un acide ribonucléique puisqu'elle est susceptible d'être inhibée par l'action d'une ribonucléase pendant la période d'induction (11). D'autres travaux ont montré que l'ARN pouvait en effet jouer un rôle important dans le processus de la transformation tumorale chez les végétaux. Des hyperplasies dont le caractère tumoral n'a pas été défini selon les critères requis ont été obtenues à la suite d'inoculation de préparations d'acides ribonucléiques totaux extraits soit des bactéries *A. tumefaciens* (36) soit de tumeurs végétales initialement induites par des bactéries de souche virulente (31). Beljanski *et coll.* (3) ont mis en évidence, chez *A. tumefaciens*, deux fractions d'ARN, l'un lié à une ADN polymérase dépendante de l'ARN (transcriptase inverse) et l'autre lié à l'ADN de la bactérie. Ces deux fractions d'ARN, purifiées et ne contenant pas d'ADN, ont été inoculées dans des plantes saines (fragments de tiges de *Datura stramonium*) cultivées dans des conditions auxiniques bien définies. Ces ARN provoquent l'apparition d'excroissances dont le caractère tumoral a été démontré (1, 3).

Le problème se pose de savoir si des mutants d'*A. tumefaciens* devenus incapables d'induire des hyperplasies de prolifération illimitée doivent cette déficience à ce qu'ils ne peuvent élaborer ou libérer un ARN infectieux dans les conditions habituelles de nos expériences de cancérisation. Les résultats présentés ici montrent que six mutants d'*A. tumefaciens* qui ont totalement ou partiellement perdu la capacité d'induire les tumeurs, synthétisent un ARN oncogène capable de provoquer, en association avec les "auxines," la cancérisation des cellules conditionnées chez *D. stramonium*.

Matériel et méthodes

Matériel végétal utilisé pour mettre en évidence la participation de l'ARN à l'induction tumorale

L'authenticité des diverses souches d'*A. tumefaciens* a été vérifiée par la production de 3-céto lactose (6) et par la réaction immunologique avec un sérum anti-B₆. Afin de déterminer leur capacité à induire les tumeurs, les différentes souches bactériennes ont été testées sur pois (*Pisum sativum* L., variété Annonay) selon une technique déjà décrite (23). Ceci permet donc de différencier par une méthode quantitative, les bactéries en oncogènes, "atténuées" ou non oncogènes (tableau 1).

Nous avons choisi pour nos expériences le *D. stramonium* L. à cause de sa grande sensibilité à l'action tumorigène de la bactérie. Cette plante a été utilisée pour déterminer, selon une technique décrite antérieurement (1, 3), le pouvoir oncogène des ARN provenant de huit souches d'*A. tumefaciens*. Des fragments de tiges sont prélevés sur des plantes obtenues en serre et dépouillées de leurs feuilles, stérilisés par une solution d'hypochlorite de calcium (solution à 90 g/litre pendant 10 min), rincés soigneusement à l'eau stérile et mis en culture *sens inversé* dans des tubes contenant du milieu solide Murashige et Skoog (28) additionné de kinétine (3×10^{-7} g/ml) et d'acide indolylacétique (3×10^{-7} g/ml). Par suite du déplacement polarisé de l'auxine de l'extrémité apicale vers l'extrémité racinaire, l'auxine endogène est alors concentrée au niveau de la section racinaire des fragments de tige. Un cal auxinique de taille limitée apparaît environ 10 jours après la mise en culture. Les préparations d'ARN (5 à 10 µg en solution dans de l'eau stérile) ont alors été introduites goutte à goutte dans une petite entaille pratiquée sous le cal dans des conditions axéniques. Sur des frag-

TABLEAU 1. Origine des divers mutants d'*A. tumefaciens* utilisés

Souche parentale	Mutants	Virulence
B ₆		+++
	V ₁₀ résistant à la valine (19)	○
	B ₆ -TR1 transformé par un ARN de <i>E. coli</i> (4)	○
A ₆		+++
	5 Gly résistant à la glycine (37)	○
	A ₆₆ sans sélection évidente (16)	+
	93 mutant spontané apparu dans une population de A ₆ résistants à la show- domycine (21)	+
AC ₅₈		+++
	A ₁₁₄ { "heat-cured" (29)	+
	A ₁₁₅ }	+

NOTE: +++, souche oncogène; +, souche atténuée; ○, souche non oncogène.

ments de tiges témoins, de l'eau stérile remplace la solution d'ARN. Les proliférations obtenues dans les deux cas ont été étudiées afin de mettre en évidence certains caractères propres aux tissus tumoraux.

La démonstration de la nature tumorale des hyperplasies obtenues en présence d'ARN a été faite par des expériences de transplantation par greffe sur des jeunes plantes de *Datura* cultivées aseptiquement in vitro sur milieu gélosé Murashige et Skoog modifié (suppression du glyocolle; kinétine, 3×10^{-7} g/ml; 2, 4-D, 10^{-8} g/ml; pH ajusté à 5.5). La technique de greffe (22) consiste à pratiquer deux incisions longitudinales le long de la tige porte-greffe, les greffons introduits dans l'entaille sont alors en contact avec le cambium. Seules les hyperplasies transplantables par greffe sont ensuite définies comme étant tumorales (8).

La culture in vitro des tissus des tumeurs obtenues après transplantation des hyperplasies induites par inoculation des ARN extraits des diverses souches d'*A. tumefaciens* a été réalisée sur milieu Murashige et Skoog modifié, renfermant ou non des substances de croissance. Les méthodes de mise en culture des tissus végétaux et leur repiquage ont fait l'objet de descriptions très complètes (13). L'ensemble des opérations effectuées pour mettre en évidence l'induction tumorale par l'ARN est résumé dans la figure 1.

Isolement de l'ARN lié à la transcriptase inverse chez *A. tumefaciens*

Les bactéries ont été cultivées à 30 °C en milieu nutritif Bacto tryptone - yeast extract - NaCl (10:5:5 g/litre; pH = 7.3), puis centrifugées et lavées en présence de Mg^{2+} , 10^{-2} M. L'isolement de l'ARN lié à la transcriptase inverse a été réalisé selon la technique décrite par Beljanski (2). L'extrait brut a été obtenu à partir de bactéries broyées dans une French cell Press puis traitées par les sons. Les ribosomes ont été éliminés par précipitation à l'aide de $SO_4(NH_4)_2$ (23% de saturation) (contrairement aux ribosomes d'*E. coli* qui précipitent avec $SO_4(NH_4)_2$ à 40% de saturation). Les protéines du surnageant ont été précipitées par $SO_4(NH_4)_2$ (70% de saturation), dialysées et adsorbées sur une colonne de cellulose DEAE (DE 52) équilibrée avec du tampon Tris-HCl 10^{-2} M (pH = 7.3). L'éluion des protéines a été réalisée par un gradient linéaire Tris-HCl 10^{-2} M (pH = 7.3), Tris-HCl 10^{-2} M (pH = 7.3) + KCl 0.5 M + mercapto-éthanol 10^{-3} M. La position de la transcriptase inverse liée à l'ARN a été recherchée par détermination de la radioactivité acido-précipitable de chacune des fractions incubées dans le milieu suivant: Tris-HCl 10^{-2} M (pH = 7.65) 25 μ mol; $MgCl_2$ 2 μ mol; 3 d-XTP (ATP + GTP + TTP) 5 nmol de chacun et d-[³H]CTP 50 000 cpm 5 nmol; fraction éluée de la colonne 0.05 ml. L'incubation a été faite à 36° pendant 20 min. L'ARN endogène sert de matrice à l'enzyme (transcriptase inverse) auquel il est lié, ce dernier pouvant donc polymériser les XTP contenus dans le milieu d'incubation. Les fractions contenant la transcriptase inverse liée à l'ARN ont été réunies et l'ARN a été séparé de l'enzyme par le phénol, purifié par le chloroforme, puis précipité par l'alcool et dialysé contre de l'eau distillée. Ce type d'ARN ne contenant pas d'ADN a été défini précédemment (2, 3). Avant d'être inoculées, les préparations d'ARN ont été traitées par le chloroforme

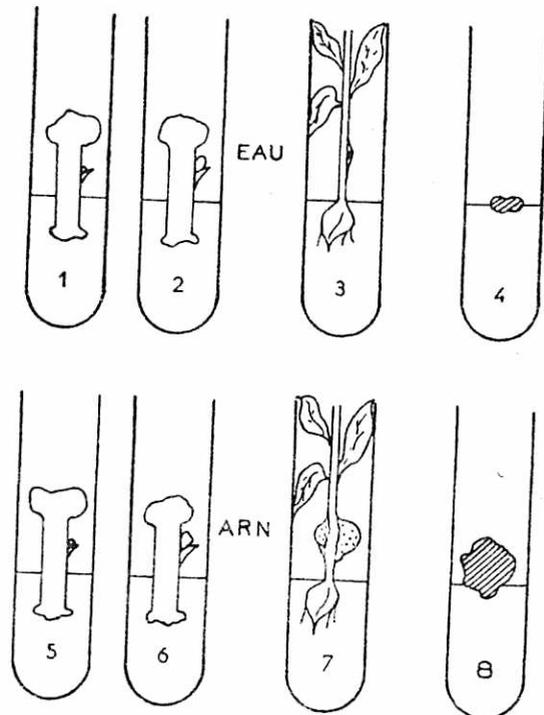


FIG. 1. Schéma représentant l'ensemble des opérations effectuées pour mettre en évidence l'induction tumorale par l'ARN infectieux. 1, dépôt d'une goutte d'eau stérile; 2, prolifération induite sur la plaie; 3, échec de la greffe du cal obtenu; 4, échec de la culture in vitro des tissus du cal sur milieu dépourvu de substances de croissance; 5, dépôt d'une goutte de la solution stérile d'ARN; 6, prolifération induite sur la plaie; 7, succès de la greffe de l'hyperplasie obtenue; 8, succès de la mise en culture in vitro des tissus de la tumeur greffée; sur milieu dépourvu de substances de croissance.

et dialysées stérilement contre de l'eau distillée. La stérilité des préparations d'ARN a été vérifiée par ensemencement sur boîte de Pétri contenant du milieu nutritif gélosé.

Résultats

1. Nous avons comparé les propriétés oncogènes des ARN extraits de bactéries atténuées (A_{66} , 93, A_{114} et A_{115}), de bactéries avirulentes (5 Gly et V_{10}) ainsi que de bactéries virulentes (A_6 et AC_{58}). Des cals volumineux apparaissent sur la presque totalité des plantes trois semaines environ après l'inoculation de l'ARN purifié et il n'y a aucune différence apparente entre les hyperplasies obtenues après inoculation des différents ARN (figure 2).

2. Les tissus des hyperplasies obtenues par inoculation de l'ARN de chacune des souches de bactéries citées ci-dessus ont été greffées sur

FIG.
cultivé
auxinic

des je
vitro
modifi
des tu
donc
plantal
Ce c
par inc
inverse
gènes)
obtenu
plantes
sont su
Les pr
traits de
après la
dont la
jours d'e
Ces résu

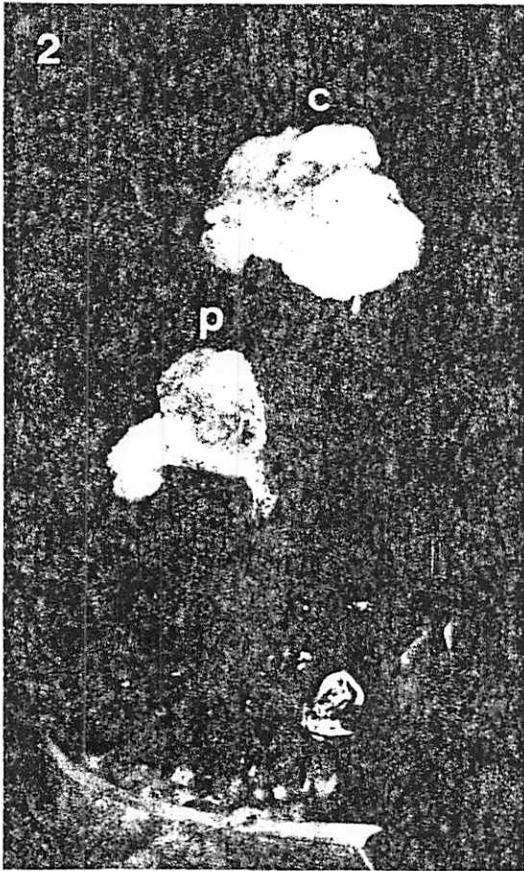


FIG. 2. Fragment inversé de tige de *Datura stramonium* cultivé in vitro et inoculé par un ARN infectieux. c, cal auxinique; p, prolifération induite par l'ARN.

des jeunes plantes saines de *Datura* cultivées in vitro sur milieu gélosé Murashige et Skoog modifié. Les greffons ont proliféré jusqu'à former des tumeurs (figure 3). Ces hyperplasies sont donc bien de nature tumorale puisque transplantables par greffe.

Ce qui caractérise les proliférations obtenues par inoculation de l'ARN lié à la transcriptase inverse extrait des bactéries 5 Gly (non oncogènes) et A₁₁₅ (atténuées), c'est que les tumeurs obtenues après transplantation par greffe sur des plantes saines sont volumineuses. Ces tumeurs sont susceptibles d'être transplantées à nouveau. Les proliférations obtenues avec les ARN extraits des bactéries des autres souches ont donné, après la première transplantation, des tumeurs dont la taille, plus limitée, ne permet pas toujours d'effectuer des transplantations successives. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus

précédemment par inoculation des ARN tumorigènes provenant des bactéries oncogènes B₆ et non oncogènes B₆-TR1 ainsi que II BN V₆ (3). Les hyperplasies induites par l'ARN extrait des bactéries B₆-TR1 donnent naissance à une lignée de cellules tumorales dont la transplantation s'effectue sans difficultés.

3. Il est généralement admis que les tissus sains ont besoin pour proliférer d'un apport exogène de substances de croissance alors que les tissus tumoraux sont capables de les synthétiser eux-mêmes. Afin de déterminer leur auxotrophie, les explantats provenant des proliférations obtenues après transplantation sur des plantes saines ont été mis en culture in vitro sur des milieux contenant ou non des substances de croissance. Les tissus des tumeurs obtenues après transplantation des hyperplasies induites par l'ARN extrait des bactéries B₆-TR1 ont subi avec succès six passages successifs sur des milieux ne contenant aucune substance de croissance, ce qui confirme bien leur caractère cancéreux. Ces expériences sont poursuivies. Les tissus tumoraux provenant des greffes des hyperplasies induites par inoculation des ARN extraits des autres souches d'*A. tumefaciens* étudiées commencent à être cultivées in vitro et la nature tumorale des explantats continuera à être éprouvée par d'autres expériences de greffe.

Discussion

La première étape de la transformation tumorale (conditionnement) correspond à l'établissement d'un état physiologique des cellules végétales qui deviennent alors sensibles à l'action transformante de la bactérie ou de l'ARN infectieux (induction), et cet état est déterminé par la blessure des tissus de la plante (10). Nos résultats font apparaître, dans les conditions de cette induction tumorale, une phase préliminaire: il semble nécessaire que le tissu conditionné ait commencé à se multiplier sous la forme d'un cal désorganisé (état précancéreux (20)) avant de devenir sensible à l'action de l'ARN infectieux. Ces considérations sont donc en rapport avec l'hypothèse selon laquelle le "principe inducteur" élaboré par la bactérie *entière* pourrait comporter plusieurs éléments de nature différente l'un d'entre eux contribuant à créer au voisinage de la plaie un afflux d'auxine (ou d'autres substances de croissance) nécessaire à l'action de l'ARN infectieux.



FIG. 3. Démonstration du pouvoir oncogène des ARN provenant d'*Agrobacterium tumefaciens*: tumeurs obtenues après transplantation des hyperplasies induites par inoculation des ARN extraits de (a) AC₃₈, (b et c) A₆, (d) A₁₁₄, (e et f) A₁₁₅, (g) V₁₀ et (h et i) 5 Gly; (c) et (f) représentent des greffes âgées de 4 mois, les autres greffes sont âgées de 1 mois; (i) correspond à une seconde transplantation. (Photos: C. Golcau, Institut Pasteur, Paris.)

d
p
ly
p
er
G
la
de
in
tu
ne
ba
de
pa
ch
du
l'A
pr
l'A
à p
sur
par
sont
par
part
géné
Le
tumor
tumor
alors
incapa
libérat
non o
bien ce
détruit
l'act
croissat
non o
pas ces
suffisant
clencher
régulatio
cellules i
Quant
lequel ce
formatio
cellules tu
peut être
inverse pa
bien cet A
hôtes per

L'un des éléments au moins du principe inducteur tumorigène (PIT) n'est pas fixé sur les plasmides auxquels Zaenen *et coll.* (40) attribuent un rôle indispensable à l'expression du pouvoir oncogène des cellules bactériennes entières. En effet, deux mutants d'*A. tumefaciens* (A₁₁₄ et A₁₁₅) obtenus après un traitement par la chaleur de la souche oncogène AC₅₈ et dépourvus de plasmides possèdent un ARN infectieux capable de provoquer l'apparition des tumeurs une fois inoculé dans les conditions de nos expériences. Il en est de même pour les bactéries de la souche II BN V₆ étudiée précédemment (38). Ceci cependant n'exclut pas la participation du plasmide lors de la tumorigénèse chez les plantes par les bactéries entières, l'ADN du plasmide pourrait coder pour la synthèse de l'ARN tumorigène (15). Par certaines propriétés, l'ARN tumorigène se rapproche de l'ARN "viroïde" isolé par Diener et Raymer (12) à partir de feuilles infectées de *Solanum tuberosum* L. et qui est capable d'induire une maladie particulière de la pomme de terre. Nos résultats sont à rapprocher également de ceux obtenus par Mishra *et coll.* (27) sur l'effet d'un ARN particulier sur la reversion d'un caractère génétique chez *Neurospora*.

Le fait que l'ARN infectieux des bactéries *A. tumefaciens* de souches non oncogènes d'*A. tumefaciens* soit capable d'induire des tumeurs alors que les bactéries dont il est issu, en sont incapables pourrait s'expliquer ainsi: ou bien la libération de l'ARN à partir de ces bactéries non oncogènes ne peut s'accomplir *in situ* ou bien cet ARN une fois excrété est rapidement détruit. Pour que l'ARN puisse exprimer son pouvoir oncogène, il est nécessaire que son action soit associée à celle des substances de croissance. On peut donc penser que les bactéries non oncogènes ou atténuées ne synthétisent pas ces substances de croissance en quantité suffisante ou qu'elles sont incapables de déclencher les mécanismes qui commandent la régulation du taux de ces substances dans les cellules infectées.

Quant au mécanisme d'action *in vivo* par lequel cet ARN oncogène participe à la transformation des cellules saines de la plante en cellules tumorales, il y a deux possibilités: l'ARN peut être transcrit en ADN par une transcriptase inverse présente dans les cellules de la plante, ou bien cet ARN "s'accroche" à l'ADN des cellules hôtes perturbant le processus normal de sa

replication ce qui aboutit alors à l'établissement d'un état tumoral. Le mécanisme par lequel les bactéries entières *A. tumefaciens* induisent des tumeurs est sans doute le même que celui par lequel l'ARN infectieux agit.

Conclusions

Les bactéries *A. tumefaciens* (souches oncogènes, atténuées ou non oncogènes) possèdent toutes un élément indispensable à la cancérisation, c'est-à-dire un ARN infectieux capable de donner par inoculation à des tiges de *Datura* en culture des proliférations susceptibles de subir une transplantation par greffe. Il est important de noter que dans ce cas, comme dans celui des expériences précédemment citées (3), les hyperplasies induites en présence d'un ARN n'apparaissent que si l'inoculation est faite au voisinage d'un cal "auxinique." Ces conditions particulières sont réalisées par l'inversion du fragment de tige dans le milieu de culture ce qui provoque un afflux d'auxine à son extrémité supérieure. Les mêmes préparations d'ARN inoculées à des tiges de *Datura* *in vivo* en serre ne donnent lieu à aucune excroissance appréciable.

Les préparations d'ARN obtenues à partir des bactéries de souches non oncogènes B₆-TRI, 5 Gly et A₁₁₅ ont donné des proliférations supportant des transplantations successives. Cependant, les hyperplasies induites par inoculation des ARN extraits d'autres souches d'*A. tumefaciens* (tableau 1) ont donné après la première transplantation des tumeurs de taille limitée. Bien que les conditions expérimentales soient apparemment les mêmes, ces résultats pourraient s'expliquer par des différences dans l'état physiologique de la plante inoculée et de la plante porte-greffe. Nous poursuivons l'étude de ces tumeurs afin d'en préciser les caractères. Les résultats obtenus avec l'ARN extrait des bactéries B₆-TRI sont les plus avancés puisque les hyperplasies obtenues par greffe prolifèrent en culture *in vitro* sur un milieu ne comportant aucune substance de croissance (1), contrairement à ce qui a été rapporté par d'autres (30). Les cultures des tissus tumoraux provenant des greffes des hyperplasies induites par inoculation des ARN extraits des autres souches d'*A. tumefaciens* étudiées sont en cours et les résultats définitifs seront présentés ultérieurement.

Nos résultats sont parfaitement en accord avec l'hypothèse (11) selon laquelle un ARN par-

ticulier joue un rôle important dans l'induction de la tumeur du collet chez les plantes.

Remerciements

Nous tenons à remercier très vivement M. Pierre Bourgarel de l'aide qu'il nous a apportée pour la réalisation de ce travail.

1. AARON-DA CUNHA, M. I., A. KURKDJIAN et L. LE GOFF. 1975. Nature tumorale d'une hyperplasie obtenue expérimentalement. C. R. Soc. Biol. 169(n° 3 suppl.): 755-760.
2. BELJANSKI, M. 1973. Séparation de la transcriptase inverse de l'ADN polymérase ADN dépendante. Analyse de l'ADN synthétisé sur le modèle de l'ARN transformant. C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D, 276: 1625-1628.
3. BELJANSKI, M., M. I. AARON DA-CUNHA, M. BELJANSKI, P. MANIGAULT et P. BOURGAREL. 1974. Isolation of the tumor inducing RNA from oncogenic and non oncogenic *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71: 1585-1589.
4. BELJANSKI, M., M. BELJANSKI, P. MANIGAULT et P. BOURGAREL. 1972. Transformation of *Agrobacterium tumefaciens* into a non-oncogenic species by an *Escherichia coli* RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 191-195.
5. BELTRA, R., et J. RODRIGUEZ DE LECEA. 1971. Aseptic induction of the crown-gall tumors by the nucleic acid fraction from *Agrobacterium tumefaciens*. Phytopathol. Z. 70: 351-358.
6. BERNAERTS, M. J., et J. DE LEY. 1963. A biochemical test for crown-gall bacteria. Nature (Lond.), 197: 406-407.
7. BIEBER, J., et E. SCARFERT. 1968. Zur frage der tumorbildung durch desoxyribonukleinsäure ans *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn. Phytopathol. Z. 62: 323-326.
8. BRAUN, A. C. 1972. The relevance of plant tumor systems to an understanding of the basic cellular mechanisms underlying tumorigenesis. Progr. Exp. Tumor Res. 15: 165-187.
9. BRAUN, A. C., et T. LASKARIS. 1942. Tumor formation by attenuated crown-gall bacteria in the presence of growth promoting substances. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 28: 468-477.
10. BRAUN, A. C., et R. J. MANDLE. 1948. Studies on the inactivation of the tumor-inducing principle in crown-gall. Growth, 12: 255-269.
11. BRAUN, A. C., et H. N. WOOD. 1966. On the inhibition of tumor inception in the crown-gall disease with the use of ribonuclease A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 56: 1417-1422.
12. DIENER, T. O., et W. B. RAYMER. 1967. Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. Science (Wash.), 158: 378-381.
13. GAUTHERET, R. J. 1959. La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisation. Masson et Cie, Paris.
14. GRIBNAU, A. G. M., et H. VELDSTRA. 1969. The influence of mitomycin C on the induction of crown-gall tumors. FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett. 3: 115-117.
15. HAMILTON, R. H., et M. N. CHOPAN. 1975. Transfer of the tumor inducing factor in *Agrobacterium tumefaciens*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 63: 349-354.
16. HENDRICKSON, A. A., I. L. BALDWIN et A. J. RIKER. 1934. Studies on certain physiological characters of *Phytomonas tumefaciens*, *Phytomonas rhizogenes* and *Bacillus radiobacter*. J. Bacteriol. 28: 597-618.
17. KADO, C. I., M. G. HESKETT et R. A. LANGLEY. 1972. Studies on *Agrobacterium tumefaciens*; characterization of strains 1 D₁₃₅ and B₆, and analysis of the bacterial chromosome transfer RNA and ribosomes for tumor inducing ability. Physiol. Plant Pathol. 2: 47-57.
18. KOVOOR, A. 1967. Sur la transformation de tissus normaux de *Scorsonère* provoquée *in vitro* par l'acide desoxyribonucléique d'*Agrobacterium tumefaciens*. C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D, 265: 1623-1626.
19. KURKDJIAN, A. 1968. Apparition de phages au cours de l'induction des tumeurs du crown-gall. J. Microsc. (Paris), 7: 1039-1044.
20. KURKDJIAN, A., P. MANIGAULT et R. E. BEARDSLEY. 1975. Transformation tumorale chez le pois: passage d'un état précancéreux à l'état cancéreux. Can. J. Bot. 53: 3002-3011.
21. LE GOFF, L., et P. MANIGAULT. 1972. Effets de l'atténuation des bactéries sur l'expression du pouvoir oncogène d'*Agrobacterium tumefaciens*. C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D, 275: 381-384.
22. LIMASSET, P., et R. J. GAUTHERET. 1950. Sur le caractère tumoral des tissus de *Tabac* ayant subi le phénomène d'accoutumance aux hétéroauxines. C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D, 230: 2043-2045.
23. MANIGAULT, P., et A. KURKDJIAN. 1967. Influence de la lumière sur le développement des tumeurs de la plantule de Pois, *Pisum sativum* L., induites par *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Town) Conn. C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D, 264: 2304-2306.
24. MANIGAULT, P., et A. KURKDJIAN. 1970. Atténuation de la virulence et changement de forme de la bactérie du crown-gall, *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Town.) Conn. Zentralbl. Bakteriologie. 124: 733-738.
25. MANIGAULT, P., et C. STOLL. 1960. Induction et croissance de tumeurs végétales exemptes de bactéries. Phytopathol. Z. 38: 1-12.
26. MANIL, P., L. DELCAMBE et J. FOURNEAU. 1955. A propos de l'étiologie du "crown-gall": action sur le végétal des acides nucléiques extraits d'*Agrobacterium tumefaciens* Smith et Townsend. Bull. Cl. Sci. Acad. R. Belg. 41: 259-274.
27. MISHRA, N. C., M. C. NIU et E. L. TATUM. 1975. Induction by RNA of inositol independence in *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 642-645.
28. MURASHIGE, T., et F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
29. NESTER, E. W. Souches que nous devons à l'obligeance de E. W. Nester. University of Washington. School of Medicine, Dept. of Microbiology, Seattle Washington.
30. PHILLIPS, R., et D. N. BUTCHER. 1975. Attempts to induce tumors with nucleic acid preparations from *Agrobacterium tumefaciens*. J. Gen. Microbiol. 86: 311-318.