Cirad Ca
UPR Systèmes cotonniers en petit paysannat

Rapport de mission en Israël

2 - 9 avril 2005

C. Pannetier

Rapport Mission Evogene du 2 au 9 varil 2005

Déroulement de la mission :

Samedi 2 avril 2005 :
10h20 - 15h55: Paris-Tel Aviv
Accueil par laura Beckerman, transfert à l'hotel

Dimanche 3 avril 2005:
Rehovot : 09h00 - 18h00
Présentation du laboratoire Evogene par Laura Beckerman
Examen des cultures de cotonnier, des difficultés rencontrées, des résultats

Lundi 4 avril 2005:
Rehovot : 09h00 - 19h00
Poursuite des discussions avec L. Bekerman et son équipe
Démonstration de repiquage des souches embryogènes
Discussion sur les milieux de culture

Mardi 5 avril 2005:
Ramat Neguev
08h00 départ de Rehovot pour Ramat Neguev par la route
9h30 - 11h00 : Visite de la station Expérimentale
11h00 - 13h00 : retour sur Rehovot
13h00 - 14h00 : visites de la serre transgénique Evogene - de la parcelle de multiplication des 96 accessions fournies par le Cirad
14h00 - 15h30 : Repas
16h00 - 19h00 : Poursuite de l'examen des cultures et des résultats avec L. Beckerman

Mercredi 6 avril 2005:
Rehovot
09h00 - 10h00 : Discussion avec Hagai Karchi (responsable projet Abiotic Stress Tolerance) et présentation des derniers résultats Evogene
10h00 - 11h30 : Discussion sur la poursuite de la collaboration avec Ofer haviv (Directeur Général) et Julien Meissonnier (Business Development)
12h00 - 14h00 : Rencontre et repas avec R Meissner et Avi Levi (ex post-doc Laboratoire de Biologie Cellulaire Versailles et conseiller scientifique Evogene)
14h15 - 18h00 : Sevrage de plantules, essais de greffage, isolement souches embryogènes

Jeudi 7 avril 2005:
Rehovot : 9h00 - 17h00
Discussion-bilan avec L. Beckerman et Rafi Meissner (directeur scientifique)
Reprise des recommendations d'amélioration et des essais a conduire

Vendredi 8 avril 2005 :
Reprise des notes - Préparation rapport
Préparation réunion Ministère de la recherche pour projet Eureka

Samedi 9 avril 2005:
16h45 - 21h05 : Tel Aviv - Paris

Rapport Mission Evogene du 2 au 9 avril 2005

Cette mission a été réalisée dans le cadre du projet 1, du contrat cadre Evogene-Cirad qui comporte actuellement deux projets:
- projet 1 : "Training and communication of know-how on cotton genetic engineering by CIRAD to Evogene by the way of technology transfer and training in genetic transformation of cotton"
- projet 2: "Evaluation of natural germplasm provided by CIRAD to Evogene".

Je tiens à remercier pour leur accueil, leur disponibilité et la qualité des échanges, Rafi Meissner, directeur scientifique ; Laura Beckerman, responsable du projet transformation génétique ; Haigai Karchi, responsable du projet Abiotic Stress Tolerance ; Ofer Haviv, directeur d'Evogene ; Julien Meissonnier, Business Development ; ainsi que tous les membres d'Evogene avec qui j'ai pu avoir des contacts scientifiques ou "culturels et touristiques".

1. Quelques éléments sur le laboratoire Evogene :

Depuis la visite en 2004 de Bernard Hau et Marc Giband, les installations se sont étendues et le personnel a été augmenté. Une salle de culture a été installée et est dévolue au cotonnier (température de 26-27°C, éclairage vertical, pas de contrôle de l'hygrométrie).
On compte 5 à 6 personnes impliquées dans les travaux de Biologie Moléculaire (clonage, vecteurs...), 4 personnes s'occupant de tous les aspects transfert de gènes (Arabidopsis, MicroTom, Cotonnier). Laura Beckerman est responsable de cette activité transformation génétique. Pour la partie cotonnier, elle est assistée de deux personnes. Un technicien assure pour tous les programmes la préparation des milieux de culture. En bioinformatique c'est Rodrigo Yelin qui est responsable d'un groupe qui compte environ 5 agents. A noter un intéressant système de traçabilité (code barre, bases de données) qui permet de suivre tout l'historique des transformations. Une personne est chargée du développement et de la mise à jour de ces bases de données (sous Access).
Rafi Meissner est le directeur scientifique, Ofer Haviv le directeur général et Julien Meissonnier est en charge du business development. Hagai Karchi est responsable du projet Abiotic Stress Tolerance.

2. Les projets :

Concernant le cotonnier, deux projets sont développés: le projet ABiotic Stress Tolerance (ABST) et un projet sur la fibre de coton. Ce dernier est moins avancé. Un facteur de transcription a été transféré chez *Arabidopsis* sous contrôle d'un promoteur constitutif. On observe chez certaines lignées transgéniques un très important développement des trichomes.

Dans le cadre du projet ABST, de nouveaux résultats ont été obtenus, en particulier les premières lignées F1 issues du croisement d'une lignée T3 de Micro-Tom résistante avec une variété commerciale ont été testées sur 180mM de NaCl. Les illustrations que nous avons pu voir indiquent pour la F1 "transgénique" un développement racinaire, un développement végétatif et une production de fruits nettement augmentés par rapport au témoin. Ces résultats ont été obtenus avec le gène N°36 sous contrôle du promoteur Evogene 6669. C'est cette construction qui est introduite chez le cotonnier depuis début février 2005. Jusqu'à cette

période, c'est presque exclusivement la construction p35S-GusIntron qui a été utilisée pour calibrer la production de cotonniers transgéniques dans les conditions du laboratoire Evogene à partir du protocole Cirad transmis à Naama Zelinger (ex-responsable du labo transformaiton) lors de sa formation à Versailles en avril 2004.

3. Etat d'avancement de la mise en place de la régénération des plantes transformées de cotonnier.

3.1. A partir du matériel produit lors de la formation à Versailles.

Le matériel rapporté de Versailles (explants transformés, cals transformés, cals témoins) a donné les résultats attendus (cals transformés à partir des explants, tissus embryogènes à partir des cals transformés ou témoins). La production d'embryons est resté faible.
D'après les observations que nous avons pu faire, il semble que les conditions de la salle de culture n'aient pas été optimales au mois au début du projet (température faible, hygrométrie non contrôlée...). De plus la manipulation des tissus embryogènes n'était pas correcte (pas de sélection des tissus intéressants à chaque repiquage). Pendant la mission, 3 plantules ont été transférées en serre avec succès. De plus des essais de greffage ont été faits. Lorsque le greffon est suffisamment développé (1 à 2 jeunes feuilles), la greffe prend correctement. Nous avons par ailleurs ré expliquer à Laura Bekerman quelles étaient les meilleures conditions de culture pour l'obtention des plantules : forts échanges gazeux, possibilité d'utilisation de vermiculite comme substrat de culture en tube avec arrosage de milieu de culture liquide.

3.2. Mise en place du procédé à Evogene.

Des difficultés ont été rencontrées pour l'obtention de cals transformés à partir de fragments d'hypocotyles : cals compacts, chlorophylliens peu propices à l'obtention de tissus embryogènes (cals compacts et verts que nous n'avons pu voir). Il apparaît que ces difficultés sont essentiellement dues à la qualité des graines utilisées pour l'obtention des seedlings en conditions aseptiques, seedlings qui fournissent le matériel de départ, ainsi qu'aux conditions d'obtention de ces seedlings (lumière). Rafi Meissner avait donc décidé de travailler sur les explants de cotylédons et d'appliquer les conditions de culture préconisées par une équipe indienne qui leur avait fourni des graines dites à fort potentiel embryogène (Laboratoire du Dr Pental). Cependant les résultats quantitatifs obtenus à partir d'explants d'hypocotyles semblent tout à fait corrects (tableau 1). Les milieux de culture présentent de légères variantes par rapport à ceux que nous utilisons. A noter que des essais de transformation ont été réalisés avec la souche d'Agrobactérie LBA4404 qui ne s'est jamais révélée efficace dans notre expérience, bien qu'elle soit retenue par la plupart des auteurs (a-t-elle été vraiment comparée à d'autres souches par ces auteurs??).

3.2.1. Problème de germination des graines

Les graines germent très mal et il faut exciser l'embryon pour obtenir une plantule in vitro. De plus cette germination est réalisée à 25°C et en lumière normale (environ 40microEinsteincm-1). Le milieu utilisé n'est pas le milieu préconisé par le Cirad.
Nous avons rapporté quelques graines à Versailles et dans nos conditions de désinfection et de germination, elles ont germé à100% dans un délai normal. Il convient donc d'appliquer de façon précise le protocole proposé par le Cirad : désinfection, milieu de germination.
La température de culture ne joue pas un rôle essentiel dans cette étape de germination.
Par contre, pour l'obtention de cals de bonne qualité il est important de réaliser le développement des seedlings à faible luminosité (cf. protocole).

3.2.2. Obtention des cals transformés

Nous n'avons pas pu juger de la qualité des cals produits sur hypocotyles dans la mesure où depuis septembre 2004, l'ensemble des mises en culture s'effectue avec des fragments de cotylédons obtenus sur seedlings développés à la lumière

Les cals obtenus sur explants de cotylédons sont en nombre satisfaisant, mais leur aspect ne nous a pas paru très favorable: cals mous, gris. Peu de cals sont beiges, consistants comme ceux qu'on peut voir à partir d'explants d'hypocotyles (cf. illustrations du protocole Cirad).

Des indications ont été données pour la sélection et le repiquage de ces cals.

3.2.3. Obtention des souches embryogènes

Un grand nombre de lignées embryogènes ont été obtenues mais nous n'avons pu faire un bilan complet des expérimentations en terme de pourcentage d'explants donnant naissance à des souches embryogènes dans la mesure où l'ensemble des résultats n'était pas encore saisis sur la base de données. Des données fournies pour des expériences réalisées avec des explants d'hypocotyles et la souche d'Agro C58:pGC2260 pBinGusIntron, font apparaître les résultats indiqués dans le tableau 1.

Tableau 1 : Exemple de production de lignées embryogènes à partir d'explants d'hypocotyles

Essai	Date de transformation	Nombre d'explants	Nombre de cals aya donné des souch embryogènes *
36 TrV11	12/04/2004	37	19
37 TrV12	17/04/2004	180	52
38 Naama1	26/04/2004	130	17
6	06/07/2004	127	44
7	07/07/2004	120	6
15	03/08/2004	86	16
16	10/08/2004	176	20
17	16/07/2004	197	24
18	25/08/2004	84	10
23	07/09/2004	225	7
29	04/10/2004	70	4

* : Plusieurs isolements de souche peuvent avoir été faits pour un même cal mais on ne peut savoir s'il s'agit d'événements de transformation différents.

En gras essais réalisés à Versailles

On peut conclure que l'obtention de souches embryogènes à partir d'explants d'hypocotyles bien que variable d'un essai à un autre est en moyenne satisfaisante.

La plus importante observation porte sur l'aspect de ces souches qui sont très molles, ont une couleur souvent très brun-gris.

Le problème peut être du au milieu de culture utilisé et en particulier à la qualité de l'agent gélifiant (Phytagel Sigma et non Gelrite Duchefa), les milieux sont trop mous. De plus le milieu contient du glucose à 2% et non du saccharose à) 3%, ce qui implique une différence significative en terme de source carbonée mais ici essentiellement en terme de pression osmotique.

Un paramètre essentiel est le repiquage de ces cultures qui se fait sans choix des zones les plus favorables : zones claires, friables.
Lors de la mission des repiquages ont été effectués et l'aspect des cultures résultantes est nettement amélioré (information envoyée par Laura Beckerman par mail après notre retour).
Nous avons préconisé d'effectuer des contrôles du pH du milieu de culture. Une différence minime du pH peut entraîner d'importantes différences dans la texture du milieu en particulier lorsque le milieu est stérilisé à l'autoclave à des températures élevées (120°C pendant 25mn).
Actuellement les milieux sont mis à sécher quelque temps sous la hotte à flux laminaire avant utilisation. Cette pratique a également amélioré l'aspect des cultures.

Nous avons rapporté différentes cultures embryogènes témoins et transformées. Après traitement tel qu'il est réalisé à Versailles : milieu, type de repiquage, les cultures ont actuellement un excellent aspect et un taux de prolifération correct, de plus des embryons commencent à se développer. Des photos ont été envoyées à Laura Bekerman.

L'aspect des cultures embryogènes Evogene pouvait laisser supposer qu'elles n'étaient pas réellement transformées (mauvais développement sur l'agent sélectif). Pour cette raison, nous avons vérifié en réalisant un test Gus, que les cultures potentiellement transformées exprimaient le gène *Gus*. Sur 9 cultures testées, toutes exprimaient le gène *Gus*. Les résultats ont été communiqués à Evogene.

4. En résumé :

- Veiller à la qualité des milieux de culture: composition et dureté des milieux gélosés. Revenir autant que faire se peut aux milieux de culture préconisés dans le document protocole et en particulier éliminer les substances de croissance dés qu'un tissu embryogène est isolé.
- Ne pas utiliser des milieux trop "frais", mais préférer les laisser sécher sous la hotte.
- Mettre l'accent sur le repiquage des cultures embryogènes en sélectionnant les parties présentant un développement et un aspect satisfaisant.
- Utiliser le saccharose pour l'isolement et la culture des souches embryogènes
- Faire un essai comparatif entre le milieu utilisé et 1) en utilisant du gelrite Duchefa 2) en ajoutant du MgCl2 au phytagel Sigma 3) en utilisant de l'agar plante.
- Tenter, avec prudence dans la mesure où il n'y a pas de contrôle de l'hygrométrie, d'aérer au maximum les récipients de culture pour le développement des embryons et des plantules.
- Utiliser un substrat vermiculite (régulièrement imbibé de milieu de culture liquide) pour aider au développement de plantules qui semblent présenter un blocage soit dans la partie apicale soit dans la partir racinaire.
- Greffer si le développement de la plantule est bloqué, la partie apicale (1 à 2 très jeunes feuilles) sur un hypocotyle.
- Transférer les plantules en serre lorsque le développement racinaire est suffisant, en maintenant un certain confinement pendant quelques jours, ce confinement est progressivement levé.

5. Matériel fourni :

- graines OCI-Gus pour le projet fibre (calibration tests Gus)
- graines OO65 AF1 pour la production de souches embryogènes transformées de cotonnier
- souche d'Agrobactérie C58:pGV2260

6. Poursuite de la collaboration

Concernant le projet résistance aux stress abiotiques, Ofer Karchi a exprimé la volonté d'Evogene de poursuivre un partenariat avec le Cirad. Le projet 2 se poursuivra dans les termes définis dans l'accord-cadre.
Par ailleurs pour le projet 3 pour lequel un financement est actuellement recherché au travers des projets Eureka, Evogene a reçu une réponse négative (pour diverses raisons) à sa demande de financement côté israélien. Cependant Julien Meissonnier doit faire le nécessaire pour obtenir le label Eureka sur financement propre. Ceci permettra au Cirad de poursuivre ses démarches auprès du ministère de la recherche pour l'obtention d'un financement.
Au moment où ce rapport est rédigé, la rencontre de Julien Meissonnier avec l'organisme israélien a eu lieu, nous n'avons pas encore de réponse. Côté Cirad une entrevue a eu lieu au ministère délégué à la Reccherche, avec Monsieur Richard-Mollard (directeur Adjoint du département Bio-Ingéniérie à la direction de la Technologie) et Monsieur Vicaire, son collaborateur. La présentation du projet Cirad a été bien reçue et l'appui de M Richard-Molard est acquis sur la base de la qualité et de l'importance du projet.
Restent donc à régler la labellisation côté israélien et le mode de financement côté français (intervention de l'ANR???).

Lors de l'entretien avec Ofer Haviv, directeur d'Evogene, la possibilité de développer sur le projet fibre une collaboration tripartite Evogene - Bayer - Cirad a été discutée.
Marnix Peferoen (BayerCropScience) rencontré par les personnes d'Evogene aux dernières Beltwide Conferences aurait exprimé le souhait d'une telle collaboration. Ofer Haviv souhaite que ce montage puisse se faire et m'a demandé de discuter de ce point avec Bernard Hau et avec les responsables de l'Unité de Recherche Coton.