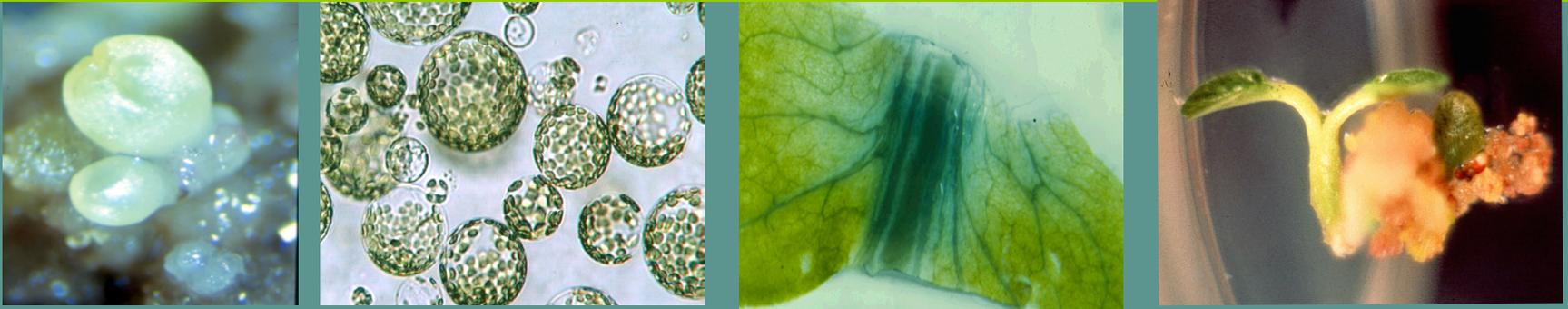


# Transformation génétique: méthodes et applications



Exemple du cotonnier *Gossypium hirsutum* L.

C. Pannetier

Cirad

Laboratoire de Biologie Cellulaire  
INRA, Institut Jean-Pierre Bourgin  
78026 Versailles cedex, France



# Transformation génétique: méthodes et applications

Exemple du cotonnier *Gossypium hirsutum* L.

1. La transformation génétique ou transgénèse et l'amélioration des plantes
2. Les conditions d'expression d'un « transgène » dans le génome d'une plante
  1. Les méthodes de transfert de gènes
  2. Les constructions autour du transgène
3. Applications :
  1. Création de variétés transgéniques
  2. Outil d'analyse du fonctionnement du génome
4. L'exemple du cotonnier

# Transformation génétique: méthodes et applications

## 1. la transgénèse et l' amélioration des plantes

L'accès direct à l'information génétique et la possibilité de la modifier renouvelle les pratiques de sélection et l'amélioration des espèces cultivées

-10000 ans	Domestication des plantes pour la culture - <b>choix</b>
1865	Mendel - <b>les lois de l'hérédité</b>
1902	Haberland - <b>Totipotence des cellules végétales</b>
1870 -1910	Méthodes modernes de sélection - <b>croisements</b>
1933	1er maïs hybride disponible aux USA
1953	<b>Structure de l'ADN</b> - J Watson et F Crick
1960	Le <b>code génétique</b> et son universalité
1965	Découverte des enzymes de restriction
1974 -1977	Une bactérie <i>Agrobacterium</i> <b>transfère du matériel génétique</b> ( ADN-T) aux cellules végétales.
1983	1ere <b>plante transgénique</b> <i>via Agrobacterium</i>
1996	1eres plantes transgéniques commercialisées aux USA

# 1. la transgénèse et l'amélioration des plantes

- **Les limites de la sélection classique**
  - Manque de caractères recherchés dans le germplasm de l'espèce ou d'autres espèces du genre.
  - Barrières d'espèces.
  - Risque d'introduction de caractères indésirables
  - Création variétale souvent longue.
- **Les limites des pratiques de culture**
  - limites des pesticides chimiques
    - » Conséquences sur l'environnement
    - » Inefficacité (apparition de résistances)

# 1. La transgénèse et l'amélioration des plantes

## Les limites inhérentes à la reproduction sexuée

Difficultés de réaliser des croisements entre espèces

Risques d'introduction de caractères indésirables

Délais souvent importants pour créer une nouvelle variété :  
nombre de générations  
cycle de végétation

## Les biotechnologies

Augmenter la variabilité et faciliter les croisements interspécifiques

- Sauvetage d'embryons
- Fusion de protoplastes
- Transgénèse**

Connaître le génome et maîtriser l'apport de nouveaux caractères

- Cartographie du génome
- SAM
- Génomique
- Transgénèse**

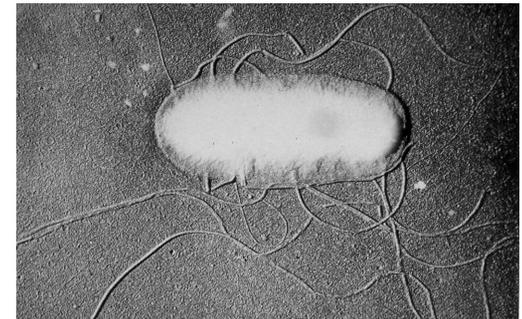
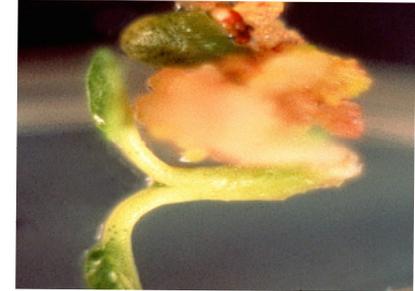
Diminuer le temps de création de nouvelles variétés

- Culture d'embryons immatures
- Haplodiploïdisation
- SAM
- Transgénèse**

# Transformation génétique: méthodes et applications

## 2. Les conditions nécessaires à l'expression d'un transgène

- **Universalité du code génétique:**
  - Rend possible l'utilisation de la séquence d'un gène quelle que soit son origine: plante, bactérie, animal
- **Totipotence cellulaire :**
  - Rend possible la régénération de plantes entières à partir d'une cellule
- **Des vecteurs de transfert de gènes**
  - Font pénétrer un fragment d'ADN jusqu'au noyau de la cellule végétale



# Transformation génétique: méthodes et applications

## 2. Les conditions nécessaires à l'expression d'un transgène

1. Faire pénétrer l'ADN dans la cellule végétale : les méthodes de transfert
2. Exprimer le gène nouvellement introduit : les constructions
3. Trier les tissus transformés : le problème des gènes marqueurs
4. Obtenir une plante transgénique exprimant le gène introduit : la régénération à partir de la (des) cellule(s) transformées

### 2.1 - Les méthodes de transfert de gènes

#### Les « vecteurs » de transformation

#### Font pénétrer l'ADN dans la cellule

- Des vecteurs biologiques:  
Essentiellement des bactéries
  - *Agrobacterium tumefaciens*
  - *Agrobacterium rhizogenes*
- Des moyens physiques :
  - Biolistique : Injection par bombardement de particules
  - Electroporation : Choc électrique pour transfert ADN dans des protoplastes ou des tissus
  - Injection d'ADN dans les fleurs (ex du cotonnier)

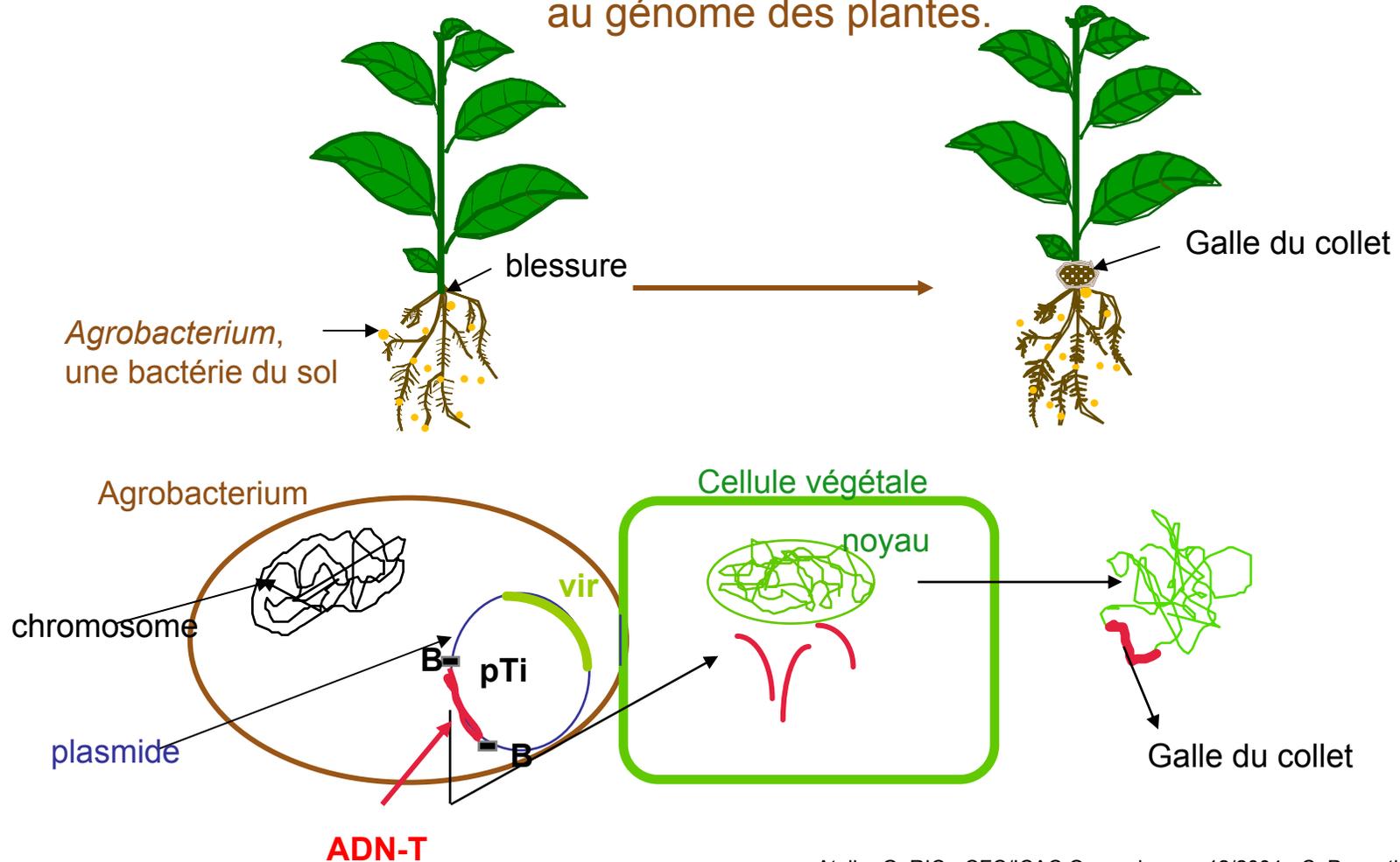
### *Agrobacterium tumefaciens*

- Histoire de la transgénèse <-----> études sur *Agrobacterium*
  - 1907 : *A.tumefaciens* agent de la galle du collet
  - 1974 : identification d'un grand plasmide
  - 1978 : plasmide Ti responsable de la galle :
    - Transfert et intégration de l'ADN-T dans le génome de la plante
    - ADN-T porte des gènes de synthèse d'auxines et cytokinines
  - 1981 : première plante transformée par exploitation de cette propriété d'*A.tumefaciens*
  - 1983 : premières plantes transformées portant un gène de résistance à un antibiotique
  - 1986 : première plante résistante à un herbicide
  - 1994 : commercialisation d'une tomate transgénique
  - 2003 : 68 millions d'Ha de plantes cultivées transgéniques / 18 pays

# 2.1 - Les méthodes de transfert de gènes

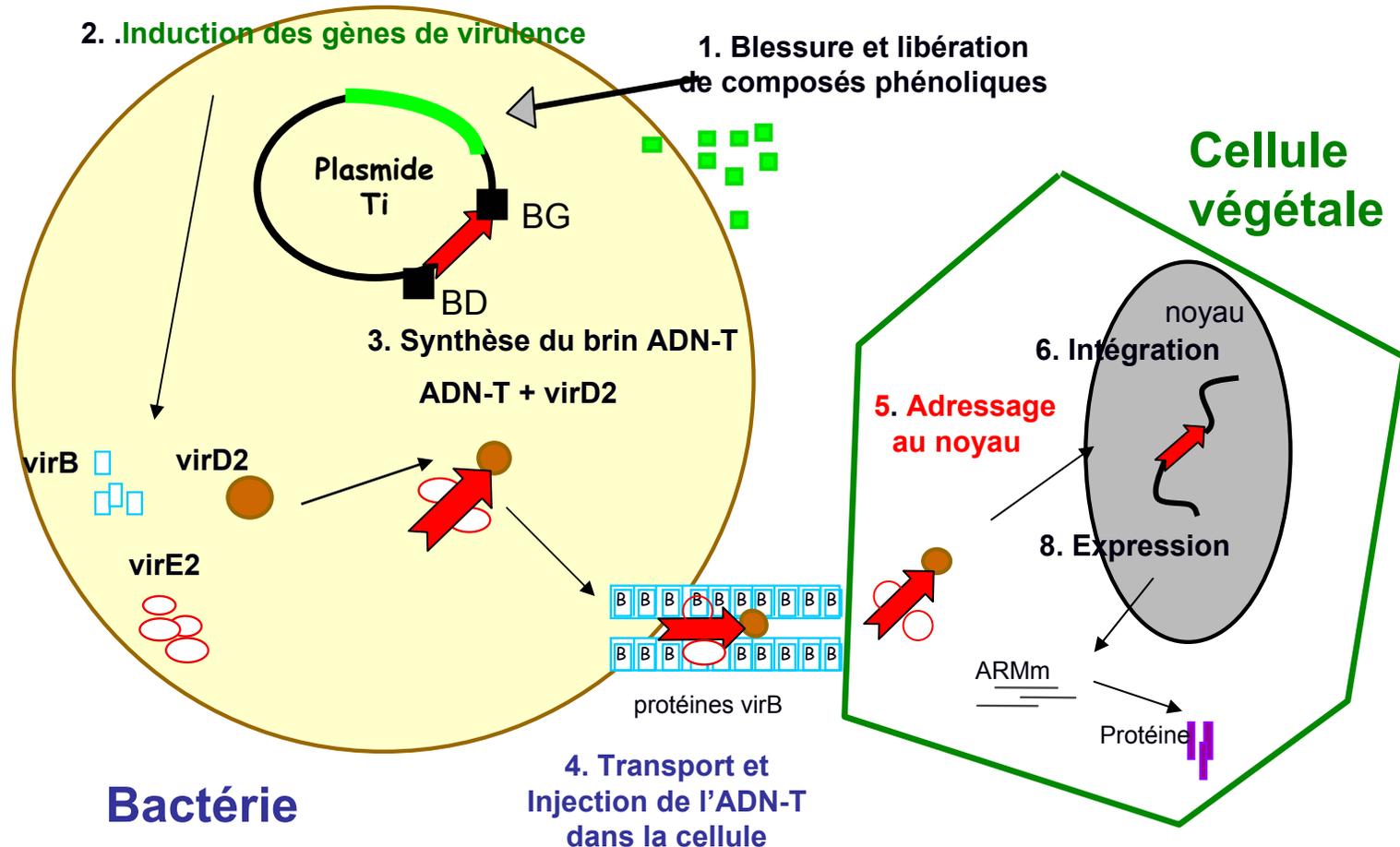
## *Agrobacterium tumefaciens* : une bactérie qui fait du génie génétique

On utilise la propriété de la bactérie de transférer de l'ADN au génome des plantes.



# 2.1 - Les méthodes de transfert de gènes

*Agrobacterium tumefaciens* transfère un fragment d'ADN précis délimité par deux séquences bordures de 25bp (BD et BG) dans le noyau de la cellule végétale



Source: L Jouanin

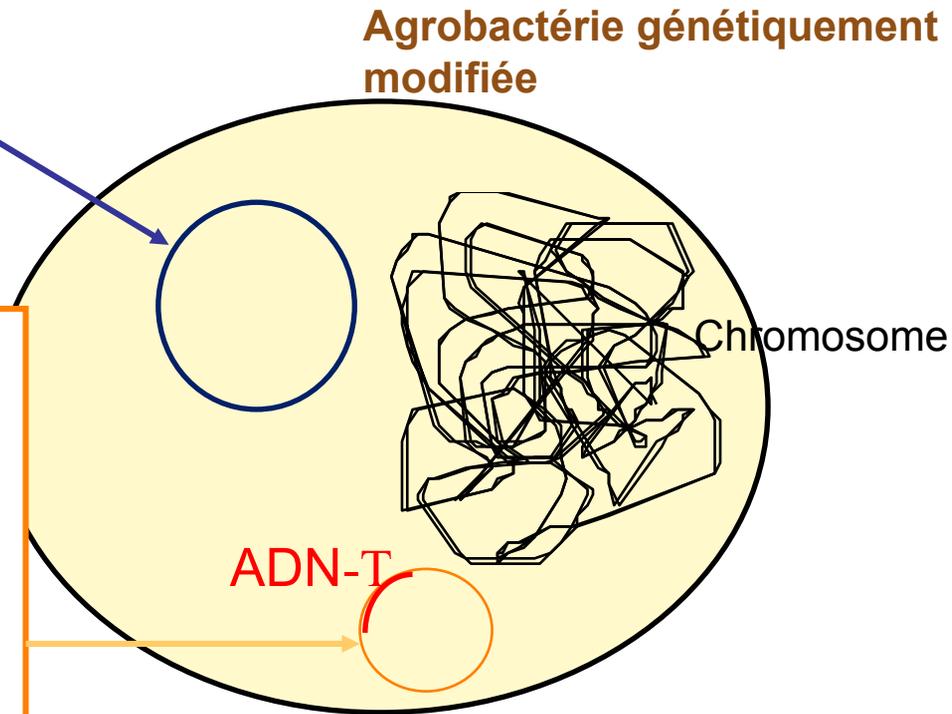
## 2.1 - Les méthodes de transfert de gènes

### *Agrobacterium tumefaciens*

Pour introduire de nouveaux gènes dans les plantes, on utilise des souches d'*Agrobacterium* incapables de produire des tumeurs

Plasmide Ti désarmé : incapable de produire des tumeurs

Plasmide portant la région (**ADN-T**) à transférer dans laquelle les gènes responsables de la formation de tumeur ont été remplacés par les gènes à transférer à la plante



# 2.1 - Les méthodes de transfert de gènes

## *Agrobacterium tumefaciens*

Bactérie « désarmée » - système binaire

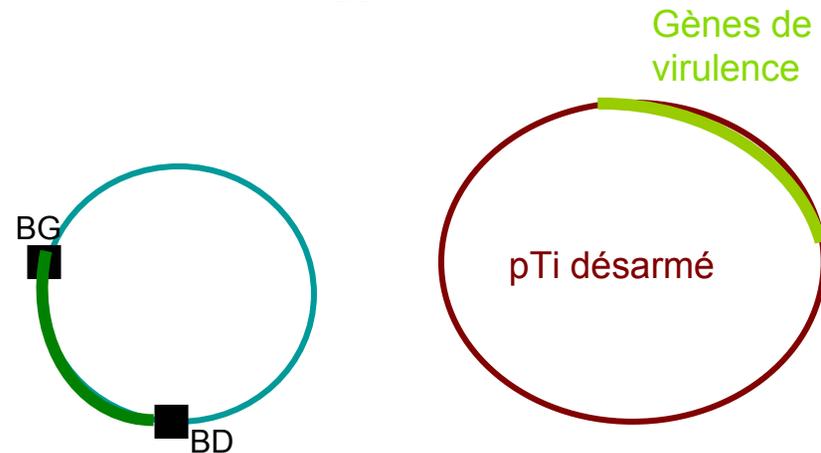
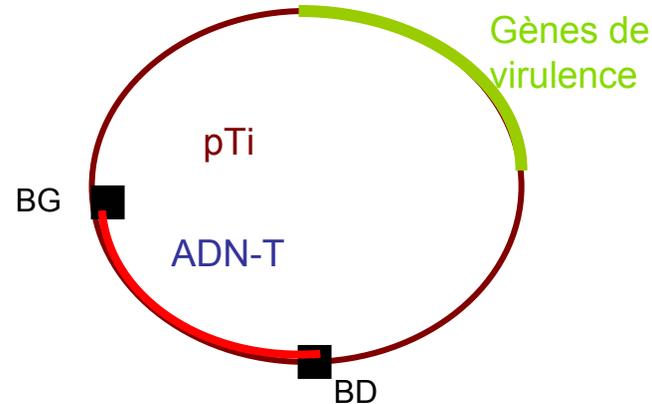


L'ADN-T porte des oncogènes responsables de la synthèse de substances de croissance qui provoquent la prolifération cellulaire



-Le plasmide Ti ne porte plus l'ADN-T mais porte les gènes de virulence qui agissent en trans

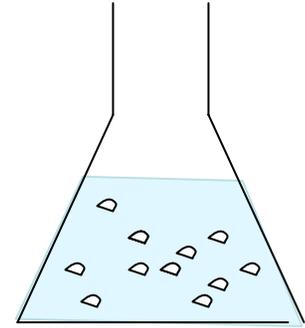
- L'ADN-T porte le gène à transférer entre les bordures



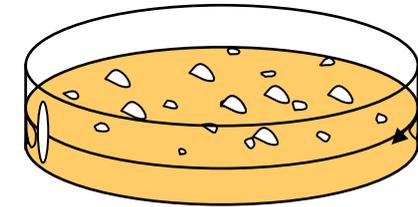
# 2.1 - Les méthodes de transfert de gènes

## *Agrobacterium tumefaciens*

Le procédé

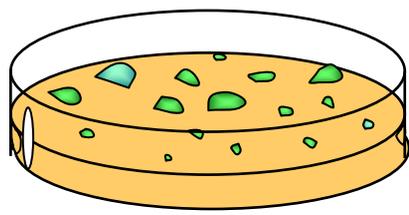
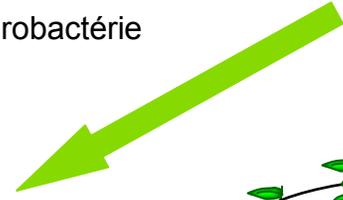


**Inoculation :**  
Explants dans suspension d'Agrobactérie

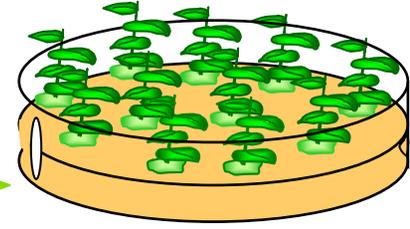


Milieu de culture pour prolifération des cellules végétales

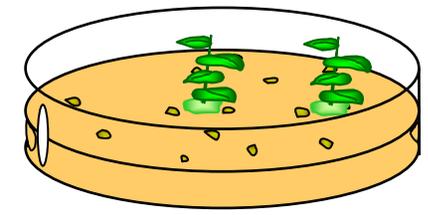
**Coculture :**  
Développement conjoint des cellules végétales et de la bactérie



Milieu de culture + antibiotique pour éliminer la bactérie



Sans sélection des cellules transformées



Avec sélection des cellules transformées

**Différenciation de bourgeons**



### *Agrobacterium tumefaciens*

#### Les limites

- Monocotylédones insensibles à la galle du collet ---> longtemps considérées comme non transformables *via Agrobacterium*
- Nécessité de régénération à partir d'explants : exception méthode infiltration fleurs ---> graines transformées (cas d' *Arabidopsis thaliana*)
- Nécessité de régénération de bourgeons à partir des cellules transformées ex: lin
- Problème du choix des souches pour obtenir les fonctions de virulence

### Des moyens physiques

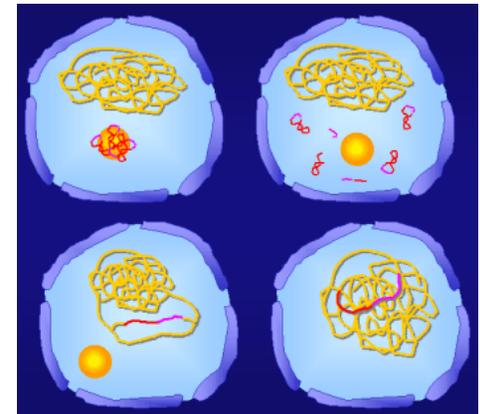
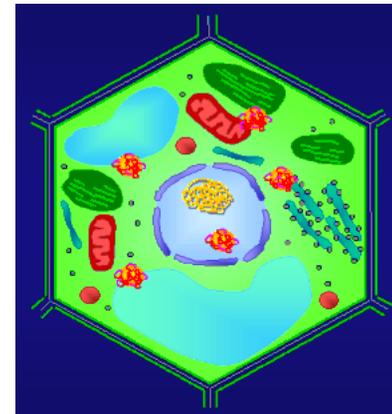
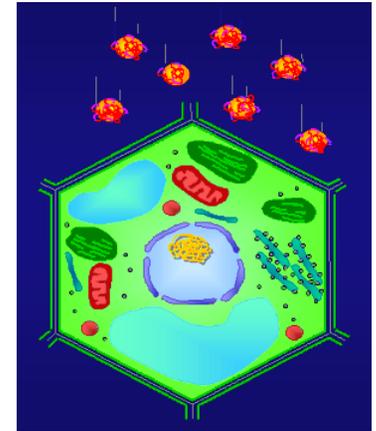
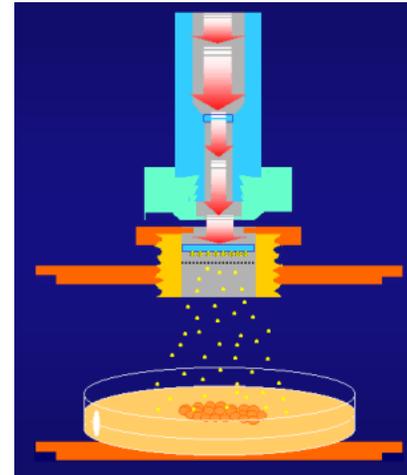
- **Biolistique** : Injection par bombardement de particules
- **Electroporation** : Choc électrique pour transfert ADN dans des protoplastes
- **Injection d'ADN dans les fleurs** (ex cotonnier)



# 2.1 - Les méthodes de transfert de gènes

## Le canon à particules

- forcer la pénétration de l'ADN à travers la paroi pectocellulosique des cellules végétales
- Envoi à très haute vitesse de billes d'or ou de tungstène enrobées d'ADN (canon à poudre ou à hélium)
- Possibilités de bombarder des organes: apex, embryons (pb chimères)
- Pas d'intégration d'un fragment bien délimité d'ADN
- Souvent très nombreuses copies du gène
- Délicate à mettre au point mais existe chez coton, soja, céréales...



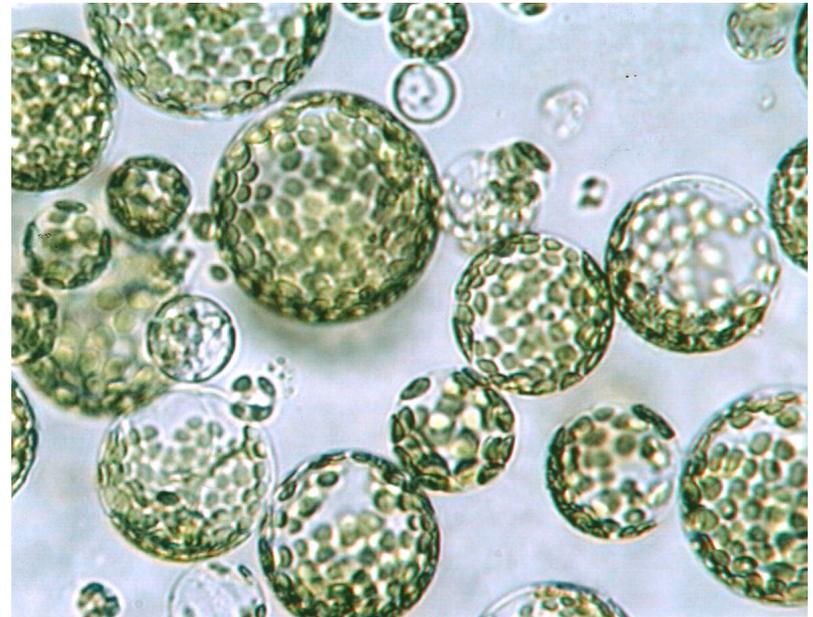
Source : La transgenèse végétale :F Casse - JC Breitler

•[http://www.univmontp1.fr/biotech/Transgenese/transgenese\\_vegetale.htm](http://www.univmontp1.fr/biotech/Transgenese/transgenese_vegetale.htm)

## 2.1 - Les méthodes de transfert de gènes

### L'utilisation des protoplastes

- Cellules de divers organes ou tissus débarrassées de leur paroi
- Pénétration de l'ADN par
  - Traitement chimique de la membrane au PEG
  - Pénétration par électroporation
- Nécessité pouvoir régénérer des plantes à partir des protoplastes
- Grand intérêt pour étude :
  - Localisation de l'expression d'un gène dans la cellule



Source : MC Chupeau

## 2. Les conditions nécessaires à l'expression d'un transgène

### 2.2 Les constructions

- Séquence codante de diverses origines.

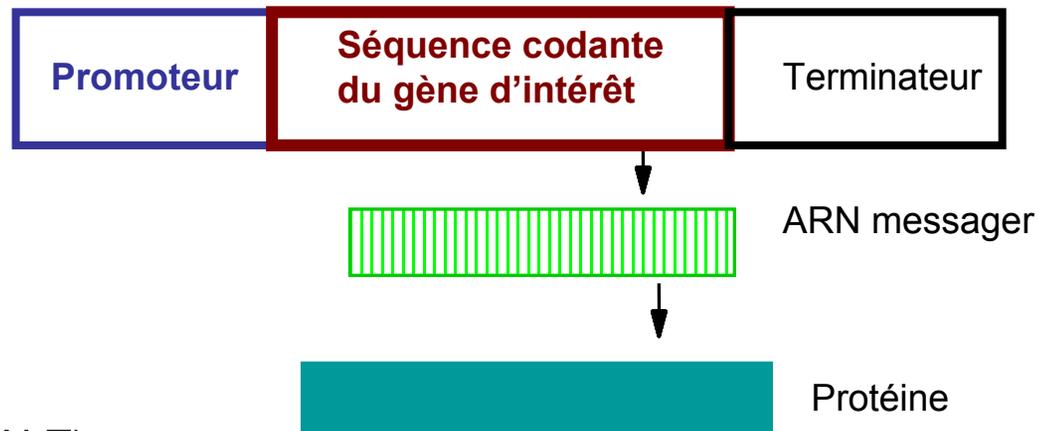
- Promoteurs fonctionnels dans un génome végétal:

- Origine

- *d'Agrobacterium* (de l'ADN-T)
- de virus
- de plantes

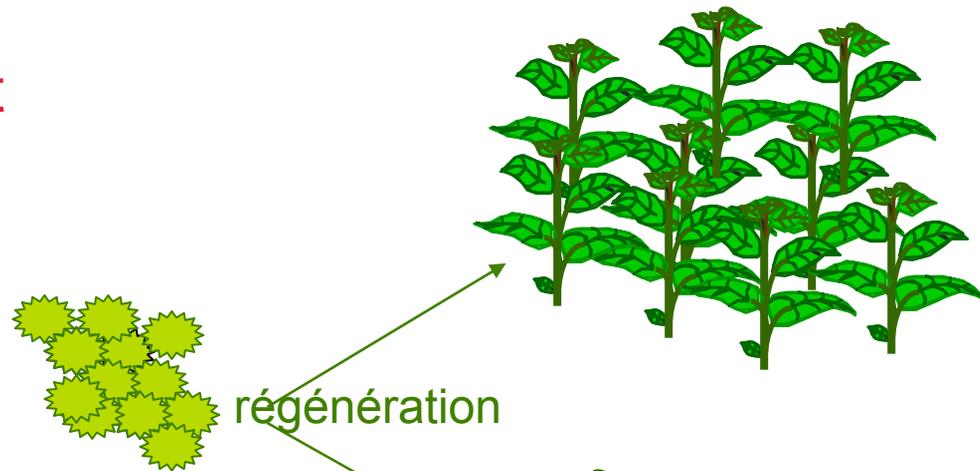
- Nature

- Constitutifs (p35S : promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou fleur)
- Inductibles : blessure, agent chimique
- Spécifiques d'organes ou de tissus : fruit, feuille, phloème



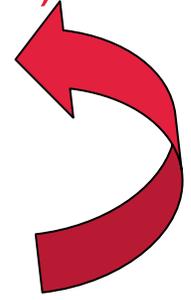
## Trier les plantes transformées

Transfert



En conditions non sélectives :  
Quelle est la plante transformée???

En conditions sélectives  
(+ antibiotique ou herbicide):  
seule pousse la plante transformée



- Gène de résistance à un antibiotique
- Gène de résistance à un herbicide



# Transformation génétique: méthodes et applications

## Les étapes d'un programme de transgénèse

- Identification du gène d'intérêt
- Utilisation d'une méthode de transformation efficace selon la plante ciblée
- Sélection d'un grand nombre de lignées transformées
- Caractérisation de ces lignées
  - présence du gène (PCR)
  - nombre de copies (hybridation Southern)
  - niveau d'expression - ARN (northern, RT-PCR)
  - présence de la protéine (analyses biochimiques - western)
  - physiologie: impact potentiel sur le phénotype
- Identification de la lignée d'intérêt: une copie, fort niveau d'expression, pas de phénotype indésirable.
- Essais aux champs

# Transformation génétique: méthodes et applications

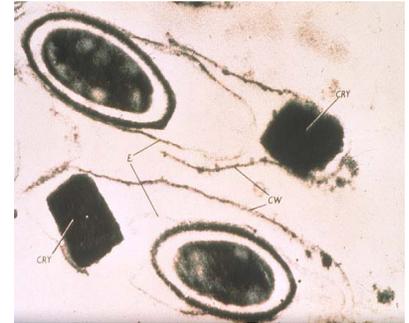
## 4. Les applications

- Introduction d'un nouveau caractère
  - Résistance aux insectes :
    - gènes de *Bacillus thuringiensis* (bactérie)
    - gènes d'inhibiteurs de protéases (plantes)
    - gènes de chitinases (insectes), gènes de lectines (plantes) ...
  - Résistance aux herbicides
  - Résistance aux virus
  - Résistance aux stress
  - ....
- Sur-expression d'un caractère déjà présent dans la plante
  - Synthèse de fructane chez la betterave à sucre
  - Nouveaux types d'huile chez le colza, le soja
- Extinction ou sous-expression d'un caractère : stratégie anti-sens, ARN interférant :
  - Moins de gluten chez le blé
  - Moins de lignine chez les arbres (pâte à papier)

## 4. 1 Les applications - création de variétés transgéniques

### La résistance aux insectes

- Les gènes de la bactérie *Bacillus thuringiensis*
  - Protéines CRY (pendant la phase de sporulation):
    - lépidoptères
    - coléoptères
  - Protéines Vip (phase végétative)
- Gènes d'inhibiteurs de protéases (origine plantes)
  - Bloquent les protéases digestives de l'insecte (problème contournement)
- Gènes de chitinases (origine insectes)
  - Action sur la mue
- Gène d'avidine de blanc d'oeuf
  - forte affinité pour la biotine
- Gènes de cholesterol oxydase
  - Toxicité sur *Anthonomus grandis*
  - Exprimé *in planta* - Problème d'interférence sur le développement de la plante
- Gènes de lectines
  - Action sur les sucres - *in planta* un certain effet sur les homoptères



### La résistance aux insectes

- Etudes de différentes stratégies
  - Expression de gènes Bt efficace (plantes aux champs)
  - IP décevants
  - Lectines : pucerons et ciccadelles
  - Nécessité d'identifier de nouvelles toxines :
    - Caractères de résistance dans le germplasm des espèces à modifier
    - Dans d'autres espèces (ex: gène Vat du melon) - dans une espèce modèle (possibilité de screening et de clonage rapides)
  - Voies de biosynthèse de métabolites secondaires à explorer
- Etudes d' impacts environnementaux, socio-économiques...

### Les résultats actuels

- Autorisées à la commercialisation : Source : Base de données OCDE
  - Coton, maïs : résistance à des herbicides (glyphosate, glyfosinate, à des insectes (lépidoptères)
  - Soja, colza, : résistance à des herbicides, qualité de l'huile
  - Papaye : résistance à des virus,
  - Pomme de terre : résistance à un coléoptère
  - Œillet : coloration de la fleur, retard à la sénescence
  - Tomate: retard au mûrissement
  - Betterave à sucre : résistance glyphosate, glyfosinate
  - Riz : résistance à un herbicide

## 4. 1 Les applications: création de variétés transgéniques

### Les résultats actuels

- En cours de développement :
  - Orge : résistance à la fusariose
  - Patate douce : résistance à un virus (SPVD) - (field release in Kenya)
  - Lentille : résistance herbicide
  - Tournesol: résistance herbicide
  - Caféier : résistance à des insectes
  - Blé : moins de gluten , résistance herbicide
  - Melon : retard au mûrissement
  - Courge : résistance à des virus
  - Pommier : résistance à des pathogènes (bactérie, champignons, insectes)
  - Peuplier, mélèze : résistance à des insectes
  - Mangue : retard au mûrissement, amélioration du goût
  - Banane : résistance aux pathogènes, production de vaccins, retard au mûrissement
  - Riz : vitamine A « golden rice »
  - Betterave à sucre : biosynthèse de fructane
  - Coton : qualité de la fibre, résistance à un virus (leaf curl virus)

Ex : Développement de la fibre de coton

*Caractéristiques technologiques*

Longueur, finesse, maturité

*Processus biologiques:*

Contrôle de la forme cellulaire

orientation des microfibrilles de cellulose

orientation des microtubules

Synthèse de cellulose

*Gènes impliqués dans ces processus*

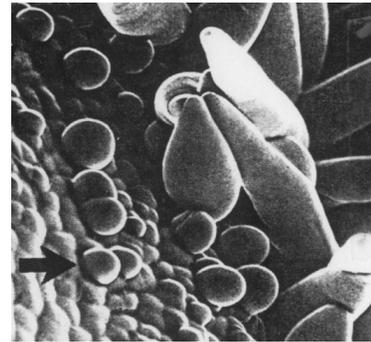
## 4. 2 Les applications: transgénèse outil de connaissance du fonctionnement du génome

### Ex : Développement de la fibre de coton

Eteindre l'expression d'un gène pour analyser sa fonction



DesprezT et al. Plant Physiol 2002.



Gènes identifiés chez *Arabidopsis*, comme impliqués dans la synthèse de cellulose et/ou la forme des cellules,

**Extinction ciblée dans la fibre des gènes orthologues**

Vecteur RNAi - inducible

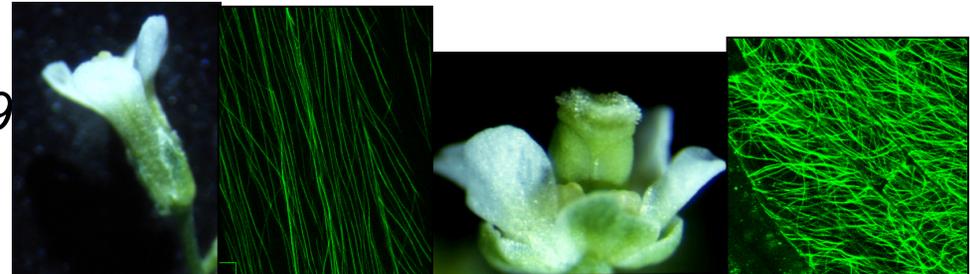
Analyse du rôle des gènes  
- dans le développement de la fibre de coton  
- sur les caractéristiques technologiques:  
- Finesse  
- Longueur  
- Ténacité....

## 4. 2 Les applications: transgénèse outil de connaissance du fonctionnement du génome

### Ex : Développement de la fibre de coton

#### Cytosquelette

- *BOTERO1* (\*AI7294□□07)
- *TONNEAU* □□1 (\*AW18739



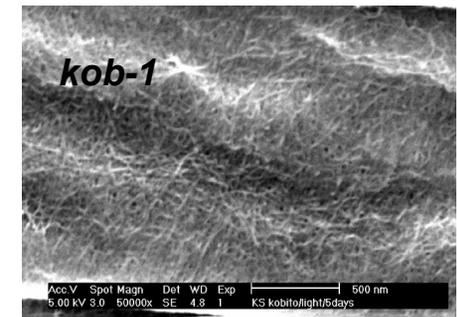
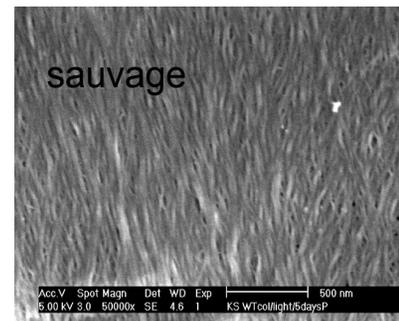
Plante sauvage

Mutant Botero

Source iconographique : H Hofte

#### Synthèse de cellulose

- 10 cellulose synthase genes
- *KORRIGAN* (\*AW729802)
- *KOBITO* (\*BF275186)
- *COBRA* (\*AI730765)



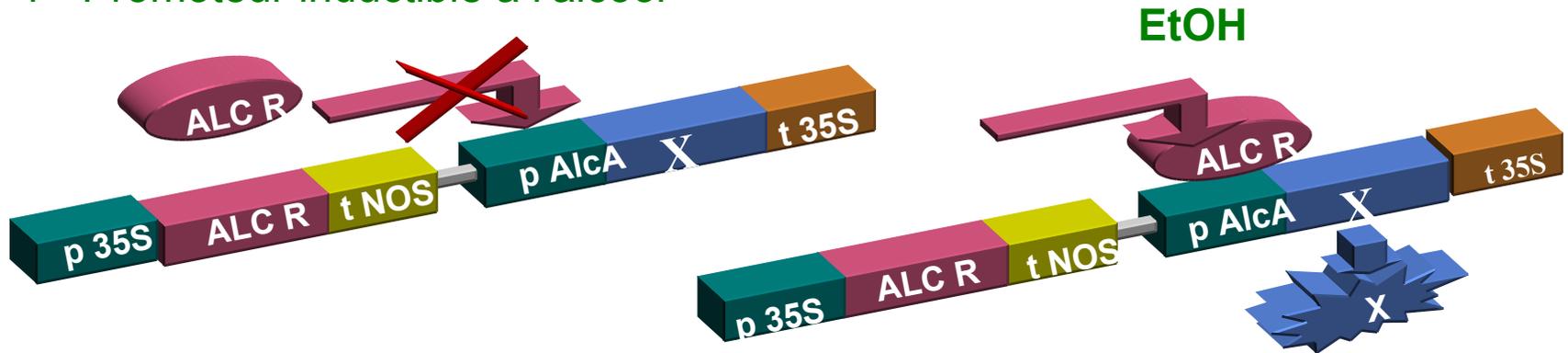
Pagant S et al 2002 The Plant Cell

\* accession n° of cotton ortholog

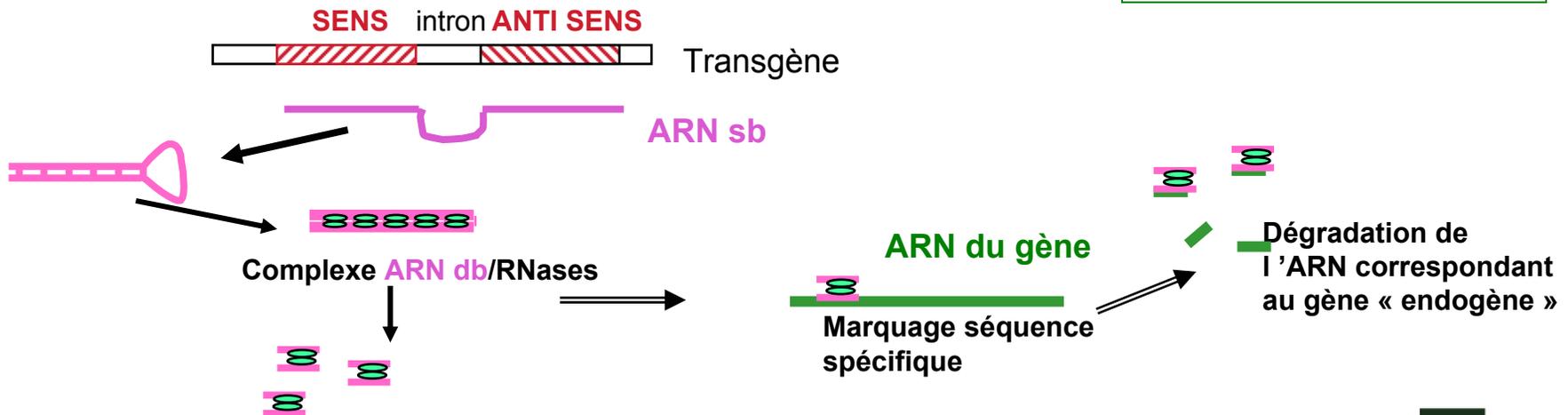
# 4. 2 Les applications: transgénèse outil de connaissance du fonctionnement du génome

## Ex : Développement de la fibre de coton Les vecteurs

### 1 - Promoteur inducible à l'alcool



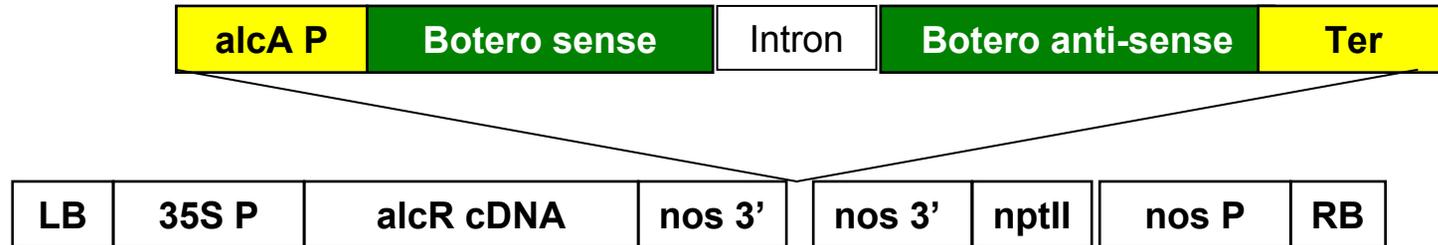
### 2 - Interférence ARN



Roslan et al 2001 Plant Journal

## 4. 2 Les applications: transgénèse outil de connaissance du fonctionnement du génome

### Ex : Développement de la fibre de coton



#### 1. Constructions des vecteurs

- Construction du vecteur RNAi - inducible
- Identification des gènes exprimés chez le cotonnier et orthologues des gènes *d'Arabidopsis*
- Clonage de séquences de ces genes dans le vecteur

#### 2. Transformation du cotonnier

#### 3. Analyse des phénotypes

- Analyse des fibres transgéniques

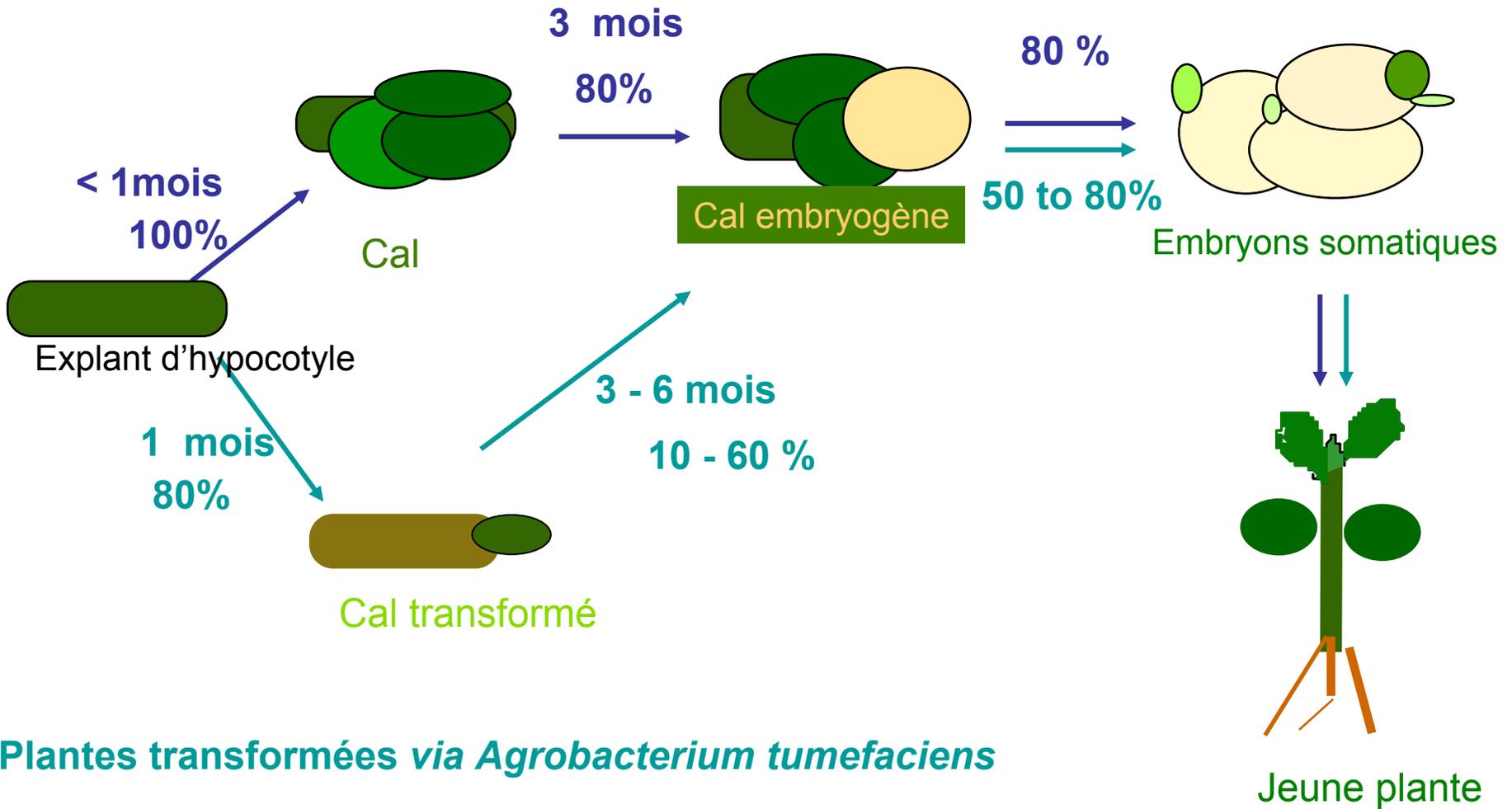
# Transformation génétique: méthodes et applications

## 3. L'exemple du cotonnier

- Enjeu majeur : la résistance aux insectes
- Une des premières espèces pour l'application de la stratégie de production *in planta* de toxine entomopathogène produite par un gène de *Bacillus thuringiensis*
- 1987 : première publication sur la transformation du cotonnier *via Agrobacterium* - première régénération de plantes *in vitro* à partir de tissus de *G. hirsutum* 1983.
- 1996 : première commercialisation de cotonniers transgéniques résistant à *Heliothis virescens* et *H. zea*

# 3. L'exemple du cotonnier

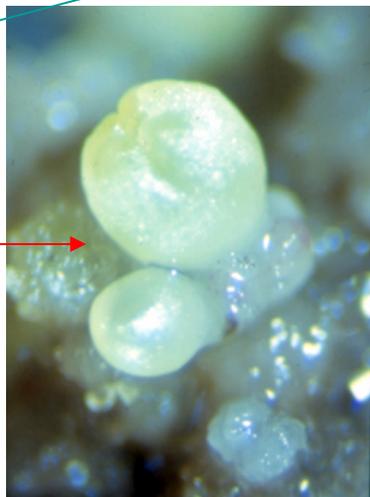
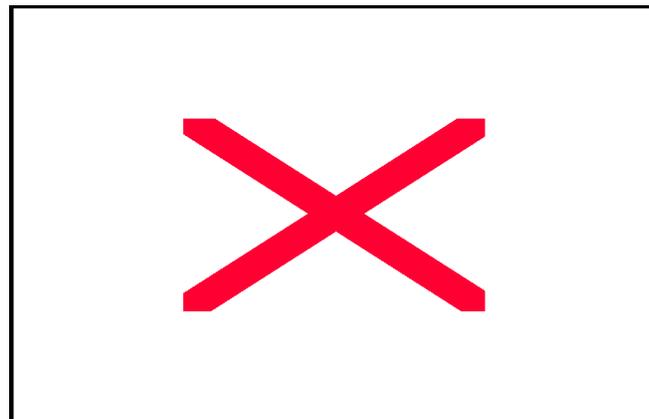
## Régénération par embryogenèse somatique



Plantes transformées via *Agrobacterium tumefaciens*

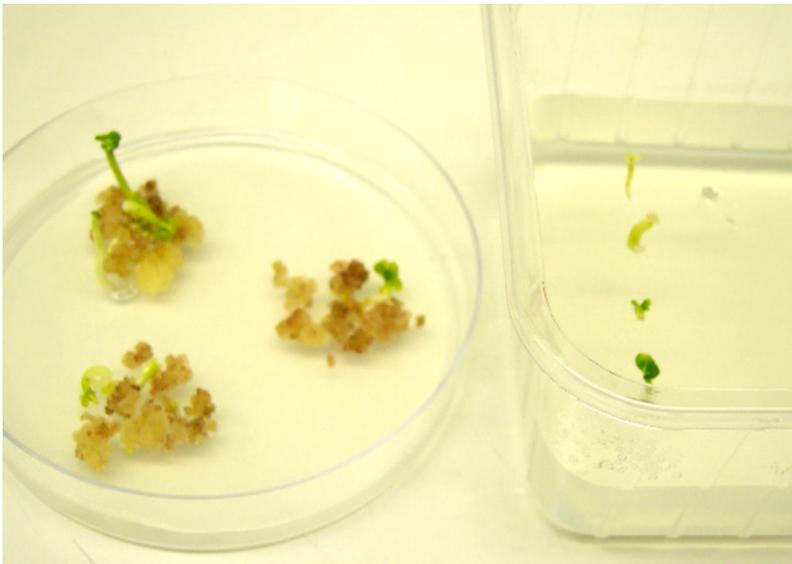
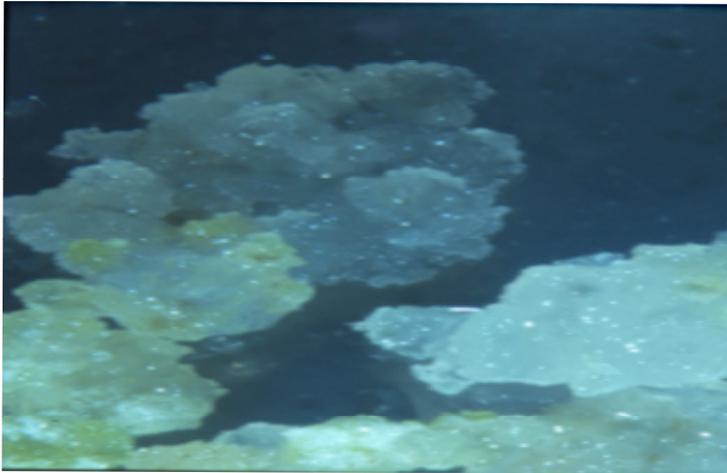
# 3. L'exemple du cotonnier

## De l'explant aux embryons somatiques



# 3. L'exemple du cotonnier

## De l'embryon au *vitro*-plant



# 3. L'exemple du cotonnier

## Du vitro-plant à la graine



# 3. L'exemple du cotonnier

## Les limites de la méthode *via* embryogenèse somatique

- Méthode consommatrice de temps, de matériel végétal, de main d'œuvre.
- Génotype dépendante : peu de génotypes (variétés Coker) régénèrent de façon efficace
- Nécessité de rétrocroisements pour développer une variété commercialisable.

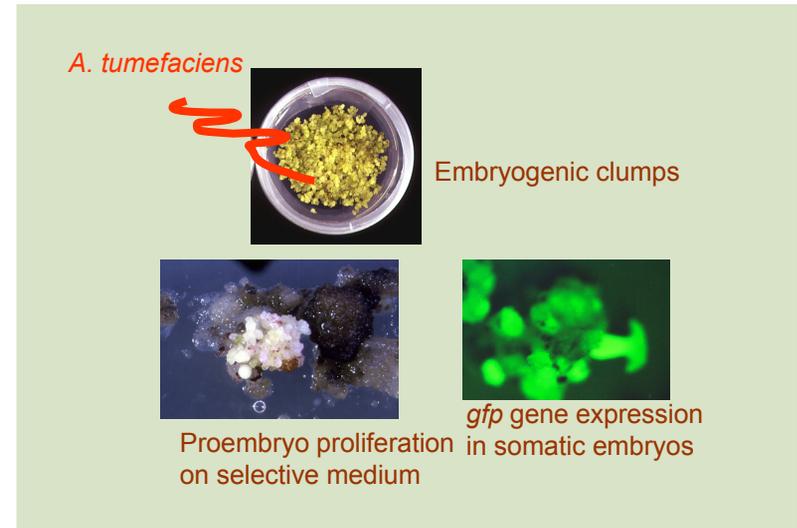


- Travaux sur l'amélioration de l'efficacité de la transformation génétique
- Développement de méthodes alternatives

# 3. L'exemple du cotonnier

## Recherches de méthodes alternatives

- **Sélection de matériel à fortes potentialités embryogènes.**  
Mishra R et al (2003) *Plant Tissue and Organ Culture* 73, 21-35.
- **Transfert sur cals embryogènes:**  
Leelavathi S et al (2004) *Plant Cell Reports* 22, 465-470.  
Pannetier et al (2003) *International Cotton Conference Cap Town*
- **Transfert dans le pollen**  
Li X et al (2004) *Plant Cell reports* 22, 9, 691-697.
- **Transformation de méristèmes**  
Gould JH, Smith RH (1988) *Proceedings Beltwide Cotton Conferences*.  
Satyavathi VV et al (2002) *Plant Science* 162, 215-223.
- **Injection d'ADN dans les fleurs :**  
« pollen tube pathway »- pratiquée en Chine  
GY Zhou et al (1983) *Methods in Enzymology*



# 3. L'exemple du cotonnier

## Les applications actuelles et les recherches en cours

- La résistance aux insectes :
  - Gènes de *Bacillus thuringiensis* : bactérie qui synthétise au cours de la sporulation des protéines entomopathogènes : gènes Cry
    - différents gènes Cry contre différents ravageurs
    - autres gènes de B.t (gènes Vip) : durabilité et spectre d'hôtes
  - Association de gènes codant pour des protéines à modes d'action différents (inhibiteurs de protéases) : problème de durabilité
- Résistance aux herbicides :
  - Glyphosate, glyfosinate, bromoxymil
- Résistance au leaf curl virus Asad S *et al* (2003) Archives of Virology
- Résistance à des champignons: *Rhizoctania solani* et *Alternaria alternata*. : gènes d'endochitinase. Emani C, *et al*, (2003) Plant Biotechnology Journal 1, 351-336.
- Qualité de la fibre:
  - Augmentation du rendement par graine ; surexpression d'un gène d'expansine : T Wilkins (2004) World Cotton Research Conference
  - Fibre naturo-synthétique (polyhydrobutyrate) : John, Keller (1996) PNAS 23, 12768-12773
  - Qualité : Li X *et al* (2004) Plant Cell reports 22, 9, 691-697.
- Résistance aux stress



# Transformation génétique: méthodes et applications

- Des plantes transgéniques déjà largement cultivées
  - intérêt principal au niveau de l'agriculteur : résistance aux insectes, aux herbicides
- Les plantes transgéniques à développer
  - qualité des produits
  - résistance aux stress, conditions limitantes de culture
- Recherches à développer sur :
  - Conditions d'introduction des plantes transgéniques dans de nouvelles zones de culture : pays du Sud / petit paysannat
  - Méthodes de transformation plus efficaces et applicables à de plus nombreuses espèces : espèces tropicales
- Outil majeur pour la compréhension du génome des plantes et à terme pour l'amélioration variétale