

# Chapitre 3

## Les étapes de la transgénèse

### Etape 1 : Identifier, isoler, intégrer et multiplier un gène d'intérêt

La première étape est le choix d'un caractère que l'on veut introduire dans la plante, comme par exemple des caractères de qualité nutritionnelle, la résistance à certains insectes, à certaines maladies, à des herbicides, etc. Ensuite, il faut procéder à l'identification et au clonage du ou des gènes à l'origine du caractère recherché. Ce gène d'intérêt peut provenir de tout organisme vivant, plante, animal ou bactérie puisque le code génétique est universel. Puis, il est intégré dans une construction génique associant souvent un gène marqueur. Ce gène marqueur permet de sélectionner les cellules qui ont intégré le gène d'intérêt. La construction est ensuite multipliée (clonée) afin de disposer d'une quantité suffisante d'ADN pour son introduction dans les cellules végétales que l'on veut transformer.

---

### Etape 2 : Transférer le gène

Il y a plusieurs méthodes pour introduire un gène dans une cellule :

**La transformation biologique.** Cette technique utilise une bactérie du sol, *Agrobacterium*, qui a la propriété de réaliser naturellement la transformation génétique d'une plante, afin de la parasiter. Ainsi, une construction génique introduite dans la bactérie (rendue avirulente au préalable) sera transférée dans la plante et intégrée à son génome. Cette technique est la plus couramment utilisée.

**Le transfert direct.** Cette technique fait intervenir :

- soit une projection d'ADN (biolistique) dans les cellules de la plante par l'utilisation d'un canon à particules qui projette dans les cellules des microparticules de métal (or ou tungstène) enrobées des constructions géniques,
- soit l'introduction d'ADN dans des protoplastes, par action d'un agent chimique ou d'un champ électrique (électroporation).

Les cellules issues de différents types de tissus végétaux peuvent être soumises à la transformation. Selon les espèces, ce seront des disques foliaires, des sections de tige, des cotylédons, des embryons, des microspores ou des protoplastes. On utilise le plus fréquemment des disques foliaires comme pour le tabac ou la tomate.

### Etape 3 : Régénérer et évaluer les plantes transformées

Après sélection des cellules transformées, il faut régénérer les nouvelles plantes transgéniques. Les cellules transformées se développent d'abord en cals, larges amas de cellules indifférenciées. Après quelques semaines, on observe le développement de pousses. Elles sont alors placées dans un nouveau milieu de culture permettant le développement des racines. Quand les racines sont suffisamment développées, les plantules sont repiquées en pot et acclimatées en serre.

La régénération *in vitro* des cellules transformées est une étape difficile à maîtriser. Aussi, le génotype, le type de tissus et les conditions de culture sont choisis en fonction de leur aptitude à la régénération.

Les plantes régénérées sont ensuite analysées à différents niveaux :

- Moléculaire : nombre de copies de transgène et intensité de son expression
- Biochimique : présence de l'enzyme traduite et de son activité
- Physiologique : morphologie de la plante, paramètres de croissance, photosynthèse, reproduction
- Agronomique : comportement en champ et paramètres agronomiques
- Ecologique : effet éventuel sur l'environnement

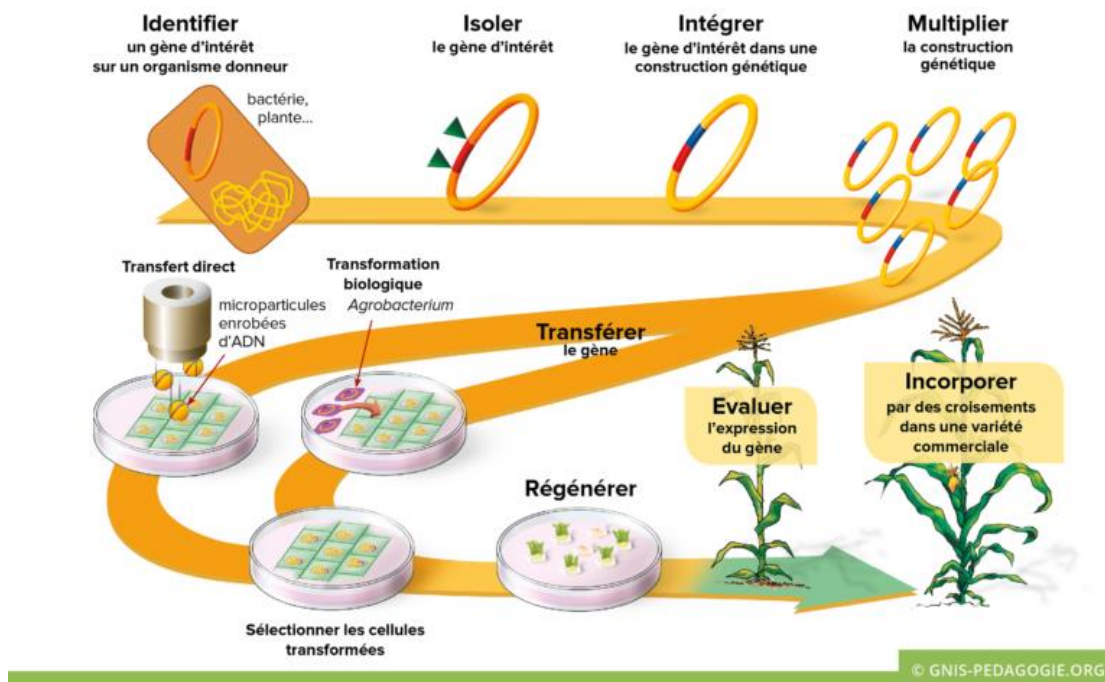
---

#### Étape 4 : Incorporer dans une variété commerciale

Les plantes transformées obtenues sont soumises à des croisements contrôlés pour étudier les modalités de transmission du nouveau caractère à la descendance.

La transformation et la régénération étant des opérations délicates, le génotype de la plante choisie est celui facilitant ces étapes. C'est pourquoi les plantes retenues sont ensuite soumises à une succession de rétrocroisements afin d'introduire le gène dans le matériel élite et d'obtenir de nouvelles variétés commerciales exprimant ce caractère.

## Les étapes de la transgénèse



### La transformation biologique

Cette technique utilise une bactérie du sol, *Agrobacterium*, qui a la propriété de réaliser naturellement la transformation génétique d'une plante, afin de la parasiter.

Ainsi, une construction génique introduite dans la bactérie (rendue avirulente au préalable) sera transférée dans la plante et intégrée à son génome. Cette technique est la plus couramment utilisée.

### Co-culture et transformation génique

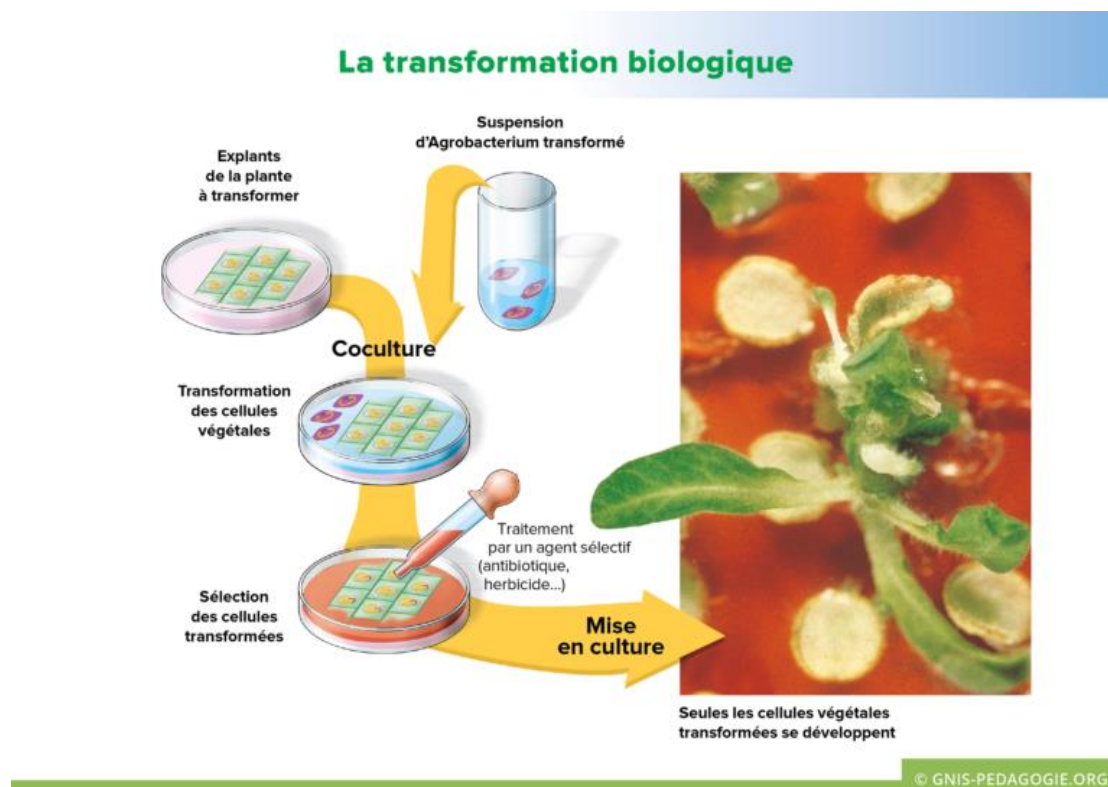
La transformation génique est réalisée en mélangeant une culture d'une souche d'*Agrobacterium* transformée, mise en suspension en milieu liquide, avec des explants de la plante, on parle de co-culture. C'est au cours de cette étape que la construction génique introduite dans la bactérie est transférée dans le génome de la plante.

### Sélection des cellules transformées

Après la co-culture, les explants sont lavés pour éliminer les agrobactéries. Il faut ensuite sélectionner les cellules qui sont effectivement transformées. Pour cela, on apporte dans la culture des explants un agent sélectif approprié : herbicide, antibiotique... Seules les cellules végétales transformées, possédant et exprimant le gène de sélection : résistance à un herbicide ou à un antibiotique, pourront se développer sur ce milieu.

## Applications

Cette technique de transformation par *Agrobacterium* a été appliquée avec succès à différentes espèces végétales dont le colza, la tomate, le coton, la pomme de terre, le soja, la courgette, le tabac, le maïs, le riz...



## L'aptitude à la transformation

Pour effectuer des transformations biologiques en routine, il est nécessaire d'avoir une méthode de transformation très efficace. Trois facteurs interviennent à ce niveau : la virulence de la souche bactérienne, la sensibilité des cellules vis à vis de la bactérie, et le choix du marqueur de sélection. La durée de la co-culture doit également être déterminée, un délai trop long peut affecter la survie des tissus et l'aptitude à la régénération.

## Le prétraitement de l'explant

L'objectif du prétraitement est de provoquer des blessures à la surface de l'explant par projection de microparticules nues. Ceci favorise et localise la transformation par *Agrobacterium* au niveau de ces fines blessures. Cette technique est notamment utilisée pour la transformation de méristèmes.

## L'utilisation d'agrobacterium

La bactérie du sol *Agrobacterium tumefaciens* provoque chez les plantes infectées une tumeur, la galle du collet. Une autre espèce, *Rhizobium* (ex. *Agrobacterium rhizogenes*), parasite également les plantes selon les mêmes mécanismes qu'*A.tumefaciens*. Elle provoque le développement anarchique et très important du système racinaire appelé chevelu racinaire.

---

### Transfert naturel de l'ADN-T par *Agrobacterium tumefaciens*

On a démontré que le parasitisme d'*Agrobacterium* repose sur le transfert d'une partie de son plasmide dans les chromosomes de la plante. Cette partie qui est transmise au génome de la plante est appelée ADN-T pour ADN Transféré.

Il s'agit d'une partie constante de l'ADN du plasmide de la bactérie qui est délimité par des bordures, bordure gauche et bordure droite, constituées par des séquences de 25 nucléotides. La région comprise entre ces frontières est transférée à la plante. Elle contient les gènes qui confèrent à la plante des propriétés tumorales, c'est-à-dire qu'ils entraînent la prolifération continue et incontrôlée des cellules végétales par production d'hormones de croissance.

Des gènes entraînant la synthèse d'opines sont également présents sur l'ADN-T. Les opines sont des acides aminés spécifiques des bactéries qui ne sont pas habituellement présentes dans les tissus végétaux sains. Les cellules végétales transformées synthétisent les opines qui favorisent la multiplication des souches pathogènes en détournant une partie de l'activité photosynthétique de la plante au profit des bactéries.

Sur le plasmide, en dehors de l'ADN-T, on trouve une région de virulence. Cette dernière n'entraîne pas directement la formation de la maladie, mais est indispensable au transfert et à l'intégration de l'ADN-T.

---

### Transfert naturel de la construction génétique par *Agrobacterium tumefaciens*

Ce transfert naturel ou biologique de gènes, à l'aide d'*Agrobacterium*, est utilisé pour transformer les végétaux.

- *tumefaciens* est la bactérie la plus employée. Le principe est de modifier son plasmide Ti afin qu'il n'y ait pas de formation de la galle du collet, mais que le transfert et l'intégration des gènes désirés dans le génome des plantes se fasse.
- Des plasmides Ti désarmés sont construits. Pour ce faire, les gènes situés sur l'ADN-T, et responsables du pouvoir pathogène de la bactérie, sont délétés. Il est toutefois

nécessaire, pour la réalisation du transfert de gènes, de garder intactes les deux bordures gauche et droite de l'ADN-T, ainsi que les fonctions de virulence. Entre les deux bordures de l'ADN-T est insérée la construction génique. Elle est ensuite introduite dans le végétal.

## Les systèmes binaires de transfert

Des constructions ont été réalisées pour diminuer la taille des plasmides et pour simplifier les méthodes d'insertion de gènes dans l'ADN-T. Ainsi, l'information génétique, nécessaire au transfert et à l'intégration dans le matériel végétal de la construction génique, a été répartie en deux plasmides.

L'un est le plasmide d'*Agrobacterium* sans son ADN-T et possédant encore les gènes de virulence. Il induit à distance le transfert de l'ADN-T recombiné de l'autre plasmide, on parle d'action en *trans*. L'autre plasmide est un vecteur de petite taille qui porte l'ADN-T recombiné, donc la construction génique. Ce vecteur, appelé vecteur binaire, possède la capacité de se répliquer dans *Agrobacterium* mais aussi dans *E. coli*. C'est donc à la fois un vecteur de transfert et un vecteur de clonage.

