

Nov 2006

La transgénèse végétale

Patrice Créte

Laboratoire de Génétique et Biophysique des plantes

TPR2, 9 ème Etage

Université de la Méditerranée

Biotechnologie

Ensemble de techniques biologiques, provenant de la recherche fondamentale, qui sont appliquées à la recherche et au développement de produits.

La biotechnologie recouvre l'emploi de l'ADN recombinant, la fusion cellulaire et les nouveaux procédés biotechnologiques.

La **biotechnologie végétale** est un domaine précis dans lequel des techniques scientifiques servent à mettre au point de **nouvelles variétés de plante**.

De nombreux chercheurs considèrent la biotechnologie végétale comme **le perfectionnement des techniques d'amélioration génétique** qui ont commencé il y a des millions d'années avec la culture de plantes sauvages pour la consommation humaine.

Petit historique

1982 : la première plante transgénique est mise au point. Il s'agit d'une plante de tabac qui résiste à un antibiotique. Cette découverte ouvre la voie à l'incorporation dans des plantes de nouvelles caractéristiques, telles que la résistance à un insecte.

1985 : les premiers essais en champ de plantes transgéniques qui résistent à un insecte, à un virus ou à une bactérie ont lieu aux États-Unis

1994 : l'Administration des produits pharmaceutiques et alimentaires (FDA) autorise la mise sur le marché d'une tomate transgénique. (conservation plus longue)

1995-1996 : la mise sur le marché du soja et du maïs transgéniques est autorisée, et le premier coton transgénique est commercialisé aux États-Unis. Il s'agit là de l'introduction sur le marché de nouveaux produits la plus rapide de l'histoire de l'agriculture

1999 : des chercheurs allemands et suisses mettent au point une variété de riz, le riz doré, qui est enrichi de bêta-carotène, ce qui stimule la production de la vitamine A qui peut prévenir certaines formes de cécité.

2000 : le premier séquençage complet du génome d'une plante, *Arabidopsis thaliana*, offre aux chercheurs de nouvelles connaissances sur les gènes qui sont responsables de traits spécifiques dans de nombreuses plantes cultivées.

Objectifs de la biotechnologie végétale

*** Modifier le génotype d'une plante**

génie génétique, mutagenèse, hybridation somatique

-introduire un nouveau caractère

-supprimer un caractère préexistant

*** Produire de la biomasse**

cellules, tissus, organes, plantes

- Utilisations variables: bio production, multiplication

La culture *in vitro*

1756: Henri Duhamel du Monceau, des bourgeons apparaissent entre le bois et le cortex quand on enlève l'écorce

1839: Schleiden et Schwann: La théorie cellulaire: la cellule végétale est capable d'autonomie et est **totipotente**

Totipotence: aptitude de la cellule végétale à exprimer la totalité des potentialités du génome pour donner un organisme entier

Cette totipotentialité cellulaire s'accompagne d'une possibilité de multiplication indéfinie que l'on peut observer dans les zones de croissance de la plante : les méristèmes, cellules restant dans un état de dédifférenciation permanent.

La culture *in vitro* : les explants

Mise au point de la culture *in vitro* à partir :

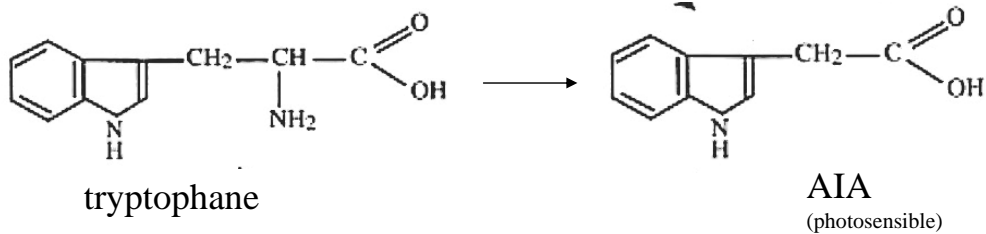
- d'explant avec cellule méristématique (non différenciée, juvénile)

- de tout type de tissus sans cellule méristématiques (dédifférenciation-redifférenciation)
 - Enchaînement de mitoses donne
 - une callogenèse
 - une organogénèse
 - une embryogénèse somatique

La culture *in vitro* : les régulateurs de croissance

L'AUXINE

dérive d'un acide aminé: le tryptophane, exp: l'acide indole acétique



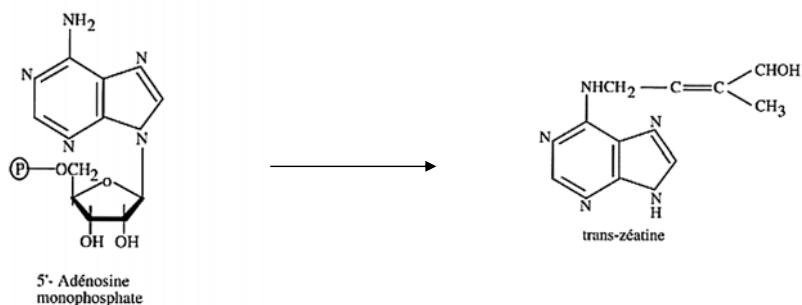
Stimulation de l'élongation cellulaire, la division cellulaire et de l'organogénèse (rhizogénèse).

La synthèse de l'auxine s'effectue dans les apex des tiges, dans les méristèmes et dans les jeunes feuilles des bourgeons terminaux.

Le transport de l'auxine s'effectue de façon polarisée, de l'apex vers la base dans la tige.

LES CYTOKININES

Dérivent d'une base de l'ADN: l'adénosine



Stimule la division cellulaire (nom en relation avec cytokinèse) et l'organogénèse (caulogénèse: bourgeon)

Synthèse dans les racines puis migrent dans la plante *via* la sève brute

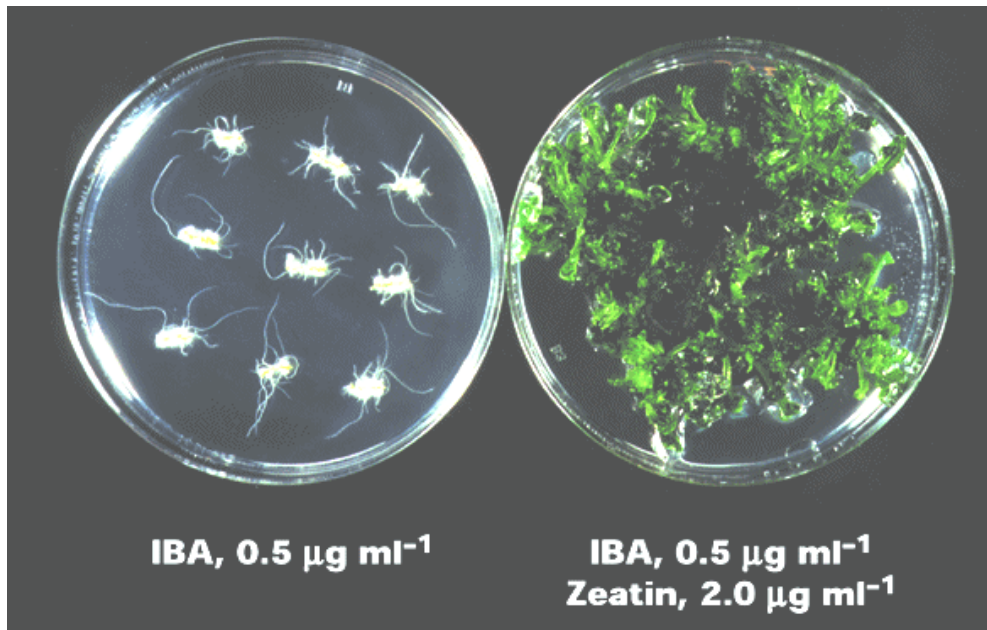
Rôle des auxines et des cytokinines dans l'organogénèse

Le rapport auxines / cytokinines détermine le devenir des tissus en culture

En concentrations égales -> division de cellules indifférenciées, callogenèse

Auxine -> formation de racines

Cytokinines -> bourgeons



La transgénèse végétale

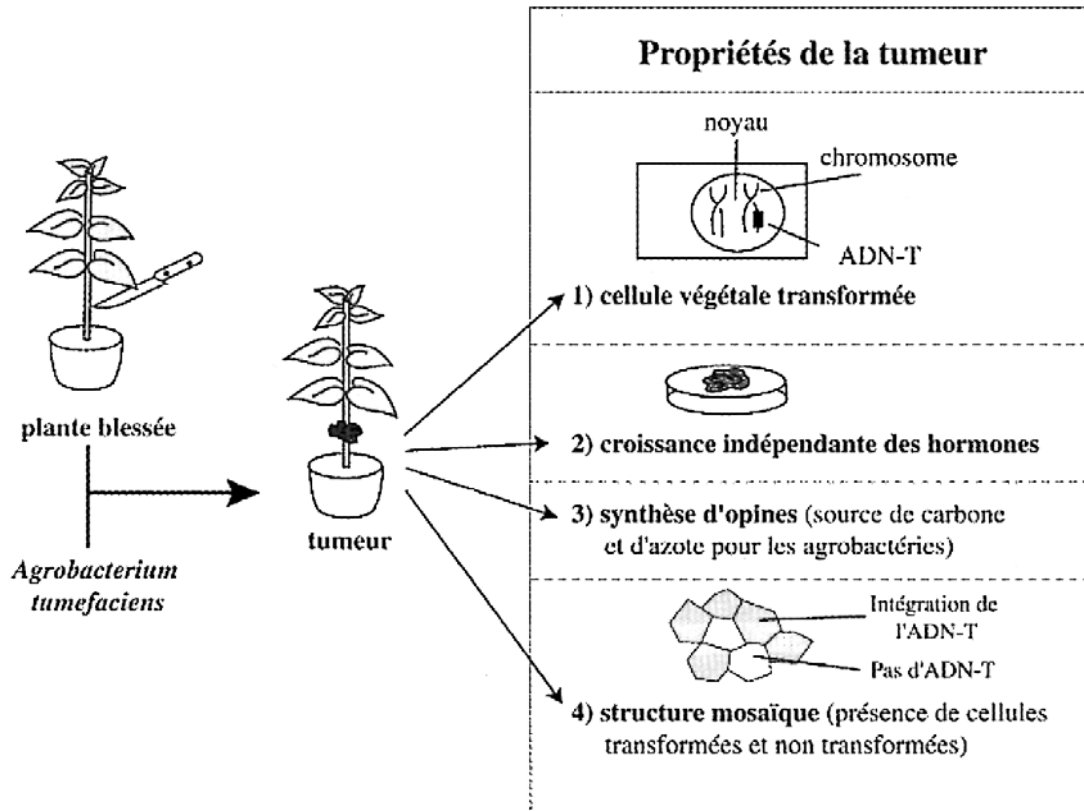
La galle du collet (crown gall)

Viticulture, sylviculture → problèmes



Smith et Townsend montrent en 1907 que le crown-gall est causé par une bactérie *Agrobacterium tumefaciens* « cancer des plantes »

Braun montre en 1943 que la tumeur peut croître indéfiniment en absence de bactéries puis en absence de substances de croissance (auxines, cytokinines).



Organisation du plasmide Ti (Tumor inducing)

Les agrobactéries hébergent de très grands plasmides nécessaires à la formation des tumeurs

ADN circulaire extrachromosomique, autonomie de réplication, plusieurs exemplaires/Cel

A. *Tumefaciens* -> plasmide Ti

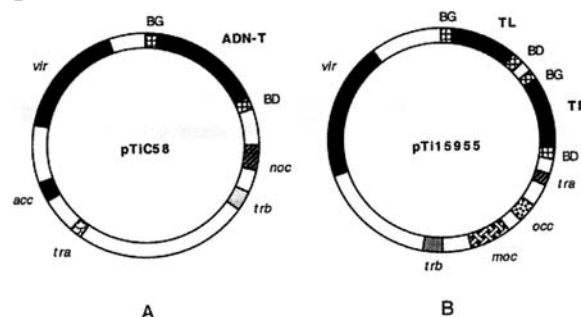


Figure 3. Organisation générale des plasmides Ti à octopine (A) et à nopaline (B).

L'ADN-T est encadré des zones de bordure : BG, bordure gauche et BD, bordure droite (plasmide pTIC58). Le plasmide à nopaline (pTI15955) possède deux parties distinctes dans l'ADN-T, une partie gauche (TL) et une partie droite (TR) qui sont transférées de manière indépendante dans la cellule végétale. *vir* : région de virulence ; *noc*, *acc*, et *occ* : régions portant le catabolisme de la nopaline, de l'agroctopine et de l'octopine ; *tra* et *trb* : régions portant les fonctions de conjugaison.

Bordures, séquences consensus

Nopaline BG	GGCTGGCTGG	TGGCAGGATATATTGTTGGTGTA	CAAATT
Nopaline BD	TATCAGTGTT	TGACAGGATATATTGGCGGGTAA	CCTAAG
Octopine ADN-TL BG	CGGCAGCGG	CGGCAGGATATATTCAATTGTA	ATGGCT
Octopine ADN-TL BD	TGATGCTGAC	TGGCAGGATATATACCGTTGTA	TTTGAG
Octopine ADN-TR BG	TGAGAAAAGG	TGGCAGGATATATCGAGGTGTA	ATATCA
Octopine ADN-TR BD	TGATGACTGA	TGGCAGGATATATGCGGTTGTA	TCATTT
Séquence consensus Ti	TG- - - - - G-	TGGCAGGATATAT- - - G-	TGTA

Les plasmides Ti

-1 ou 2 ADN-T (ADN Transféré)

-Porte des gènes de:

- Synthèse d'auxines
- Synthèse de cytokinines
- Synthèse et sécrétion d'opines

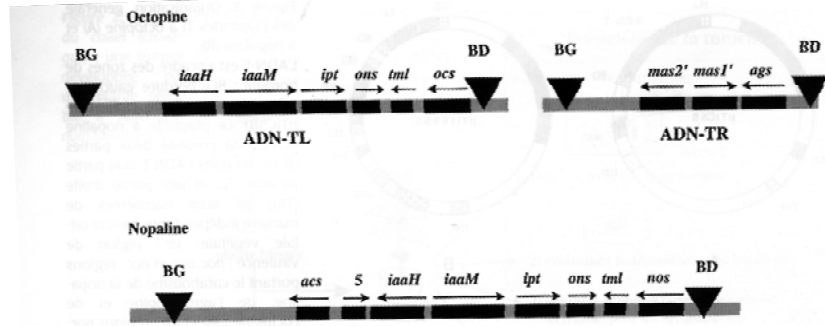


Figure 5. Localisation des oncogènes et des gènes de biosynthèse d'opine dans la région T d'un plasmide à octopine et d'un plasmide à nopaline. Cette carte met en évidence la localisation et l'orientation des différents oncogènes, des gènes de biosynthèse d'opines, et les bordures droite (BD) et gauche (BG) de l'ADN-T. La fonction de ces gènes est décrite dans le tableau 1.

Tableau 1. Nature et fonction des gènes présents sur l'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Locus	Autres noms	Fonction des protéines	Rôle dans la tumeur
<u>iaaM</u>	<i>tms1, shi, transcrit 1</i>	Tryptophane mono-oxygénase	<u>Synthèse d'auxine</u>
<u>iaaH</u>	<i>tms2, shi, transcrit 2</i>	Indolacétamide hydrolase	<u>Synthèse d'auxine</u>
<u>ipt</u>	<i>tmr, rol, transcrit 4</i>	Isopentényl transférase	<u>Synthèse de cytokinine</u>
<u>5</u>	-	Indole lactate synthase	?
<u>tml</u>	<i>transcrit 6b</i>	?	?
<u>ocs</u>	-	Octopine synthase	<u>Synthèse d'opine</u>
<u>nos</u>	-	Nopaline synthase	Synthèse d'opine
<u>acs</u>	-	Agrocinopine synthase	Synthèse d'opine
<u>mas2'</u>	2'	Synthèse de mannopine	Synthèse d'opine
<u>mas1'</u>	1'	Synthèse de mannopine	Synthèse d'opine
<u>ags</u>	σ	Synthèse d'agropine	Synthèse d'opine
<u>ons</u>	<i>transcrit 6a</i>	<u>Perméase</u>	<u>Sécrétion d'opine</u>

Les cellules transformées produisent des auxines et des cytokinines

Les gènes nécessaires au transfert du T-DNA sont portés par la zone *vir* (virulence) des plasmides Ti

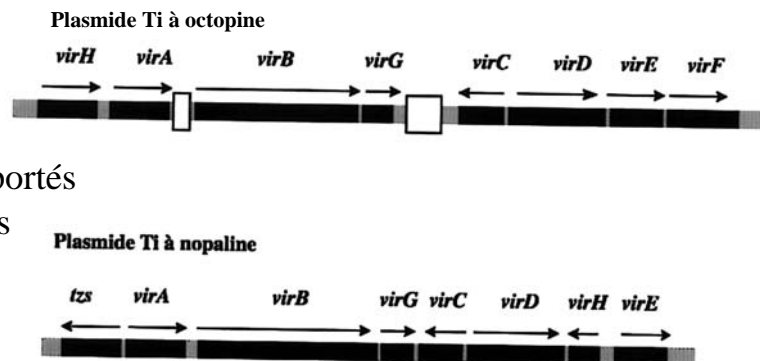


Figure 8. Organisation de la région de virulence de plasmides Ti à octopine et à nopaline. Cette carte met en évidence la localisation et l'orientation des différents loci *vir*. Les boîtes blanches indiquent les fragments d'insertion présents dans la région *vir* des plasmides à octopine. La fonction des gènes est décrite dans le tableau 2.

Tableau 2. Description des gènes *vir* présents sur les plasmides à octopine et à nopaline.

Locus	Taille (kb)	Nombre de gènes	Fonction des protéines de virulence
<u>virA</u>	2,8	1	Chémorécepteur membranaire
<u>virG</u>	1,0	1	Activateur de transcription
<u>virC</u>	1,5	2	? (VirC1 améliore le transfert de l'ADN-T)
<u>virD</u>	4,5	5	VirD1/VirD2 est une endonucléase spécifique des bordures de l'ADN-T; VirD2 pilote l'ADN-T jusqu'au génome de la plante
<u>virE</u>	2,2	2	VirE1 est nécessaire à l'exportation de VirE2 dans la cellule végétale; VirE2 protège l'ADN-T dans la cellule végétale et participe à son adressage dans le noyau
<u>virB</u>	9,5	11	Formation du pore transmembranaire permettant le passage du complexe ADN-T/protéines dans le cytoplasme des cellules végétales
<u>virF</u>	1,0	1	? (Les mutants de <i>virF</i> ont un spectre d'hôte altéré)
<u>virH (pinF)</u>	2,8	2	Mono-oxygénase du cytochrome P450
<u>tzs</u>	1,0	1	Biosynthèse de cytokinine

Mutations dans *vir A, B, D et G* abolissent l'aptitude à induire les tumeurs

Mutations dans *vir C, E, F et H* →
-restriction du spectre d'hôte
-atténuation du phénotype tumoral

Gène = ORF, Opéron = plusieurs ORFs

Dans le plasmide Ti, en dehors de la région T et de la région *vir*

Gènes impliqués dans les fonctions de :

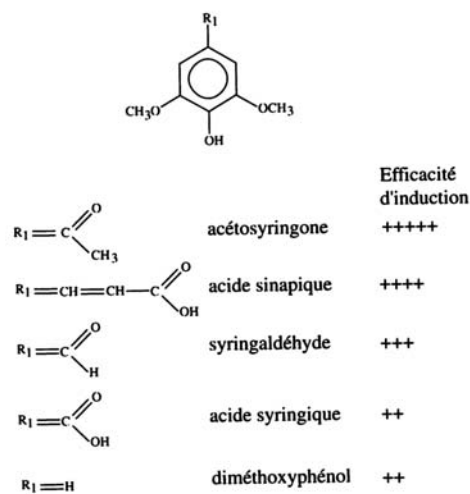
- répllication du plasmide (région *ori*)
- d'incompatibilité (région *inc*)
- de transfert conjugatif (région *tar*)

Il y aurait 195 ORF:

- 20 gènes impliqués dans la conjugaison
- 3 gènes de répllication
- 7 gènes de modification du plasmide
- 22 gènes de pathogénèse
- 38 gènes assurant le transfert de l'ADN-T
- 24 gènes impliqués dans le métabolisme des opines
- 12 gènes assurant des fonctions diverses telles que le transport de ribose, le chimiotactisme...
- 84 séquences non répertoriées

Les inducteurs des gènes de virulence

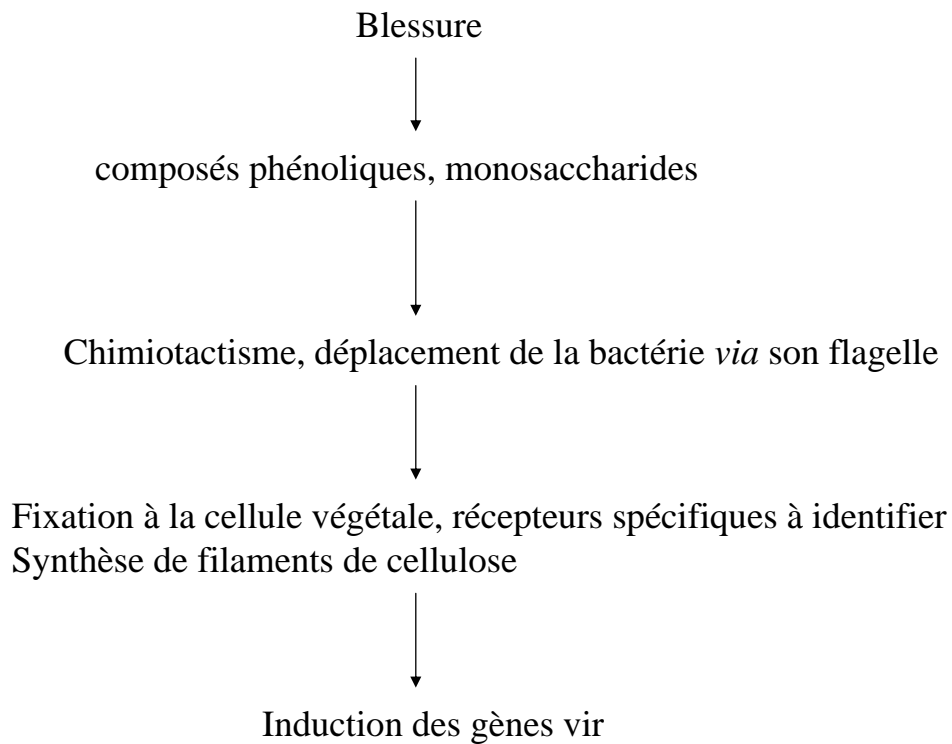
La transcription des gènes *vir* est induite par des **composés phénoliques** émis par les cellules blessées ex: acétosyringone



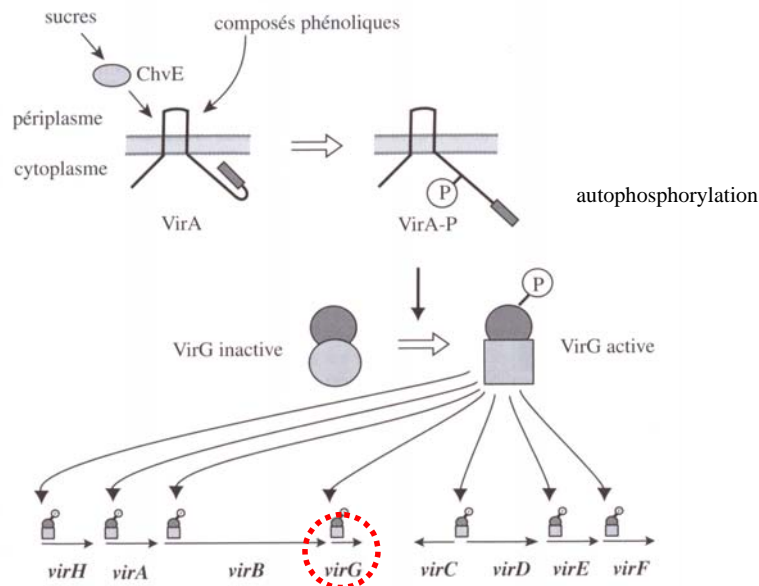
Egalement induction par **monosaccharides** (arabinose, fucose, xylose → constituants de la paroi ...)

Induction par **pH extracellulaire** très bas (5 - 5,5) → inhibition de la croissance bactérienne donc favorise le transfert de l'ADN-T

Reconnaissance cellules végétales - bactéries



Modèle d'activation des gènes de virulence



virA expression constitutive, chimiorécepteur membranaire

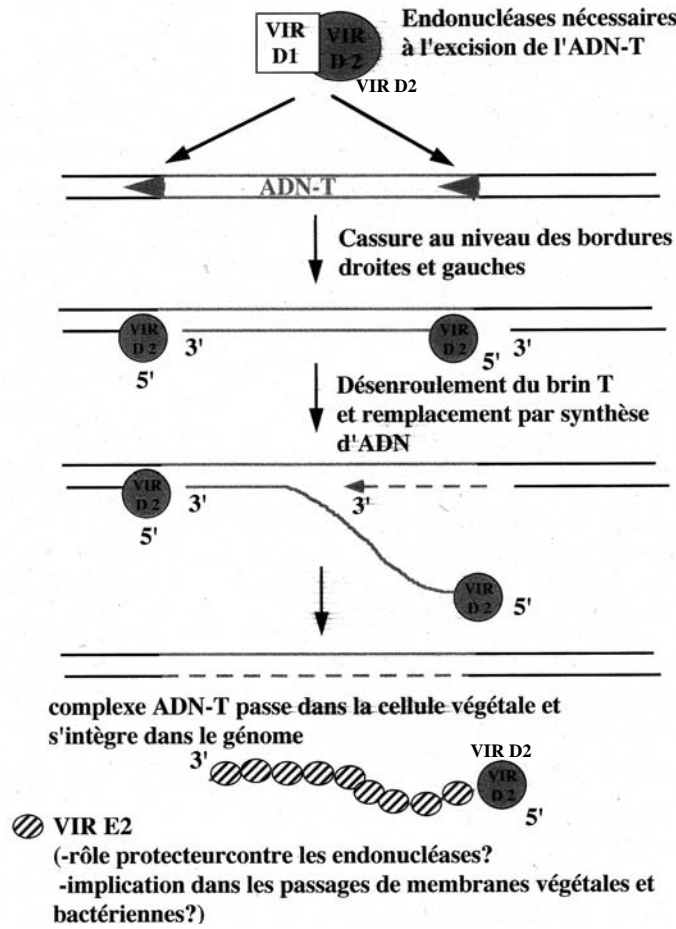
chvE nécessaire dans l'induction par les sucres monosaccharides

VirG interagit avec boîtes *vir* dans région promotrice des opérons (12pb conservées)

Autorégulation de *virG*,

Souche hypervirulente = forte quantité de *virG* (quand croissance libre, peu de *virG*)

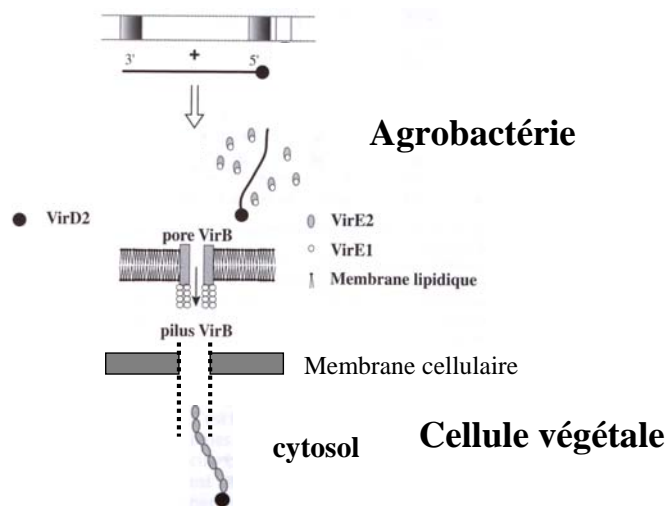
Modèle de synthèse de l'ADN-T



Modèle de synthèse de l'ADN-T

Transfert dans le cytoplasme de la cellule, apparenté à une conjugaison de type bactérien

VirD2 et VirE2 contiennent un signal de localisation nucléaire




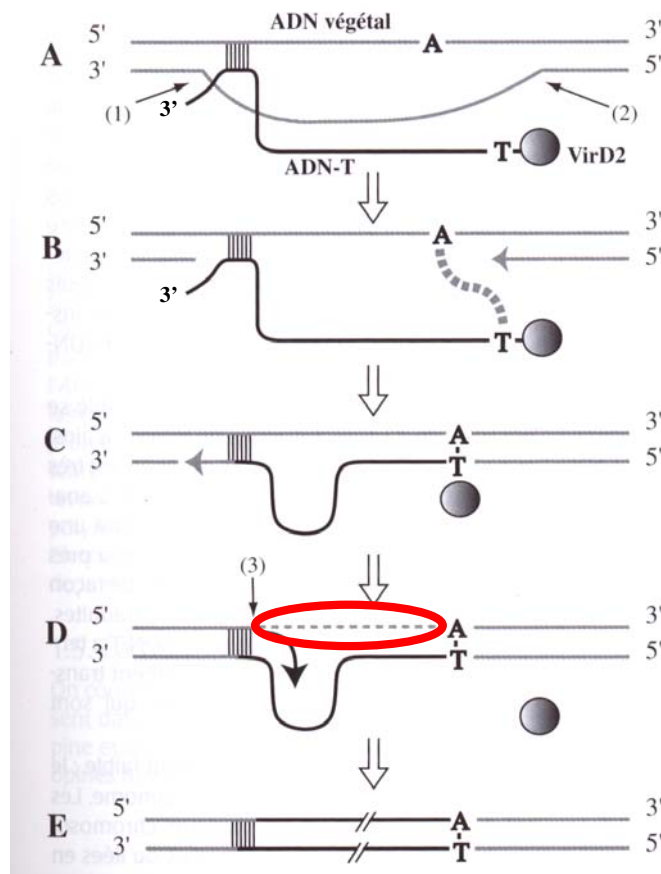
● VIR E2
 (-rôle protecteur contre les endonucléases?
 -implication dans les passages de membranes végétales et bactériennes?)
 VIR B (contient des parties hydrophobiques suggérant un rôle membranaire, peut-être impliquée dans le passage du complexe ADN-T)

Modèle d'intégration de l'ADN-T dans l'ADN végétal

Recombinaison non homologue !

Utilise la machinerie cellulaire

 = délétion de l'ADN génomique

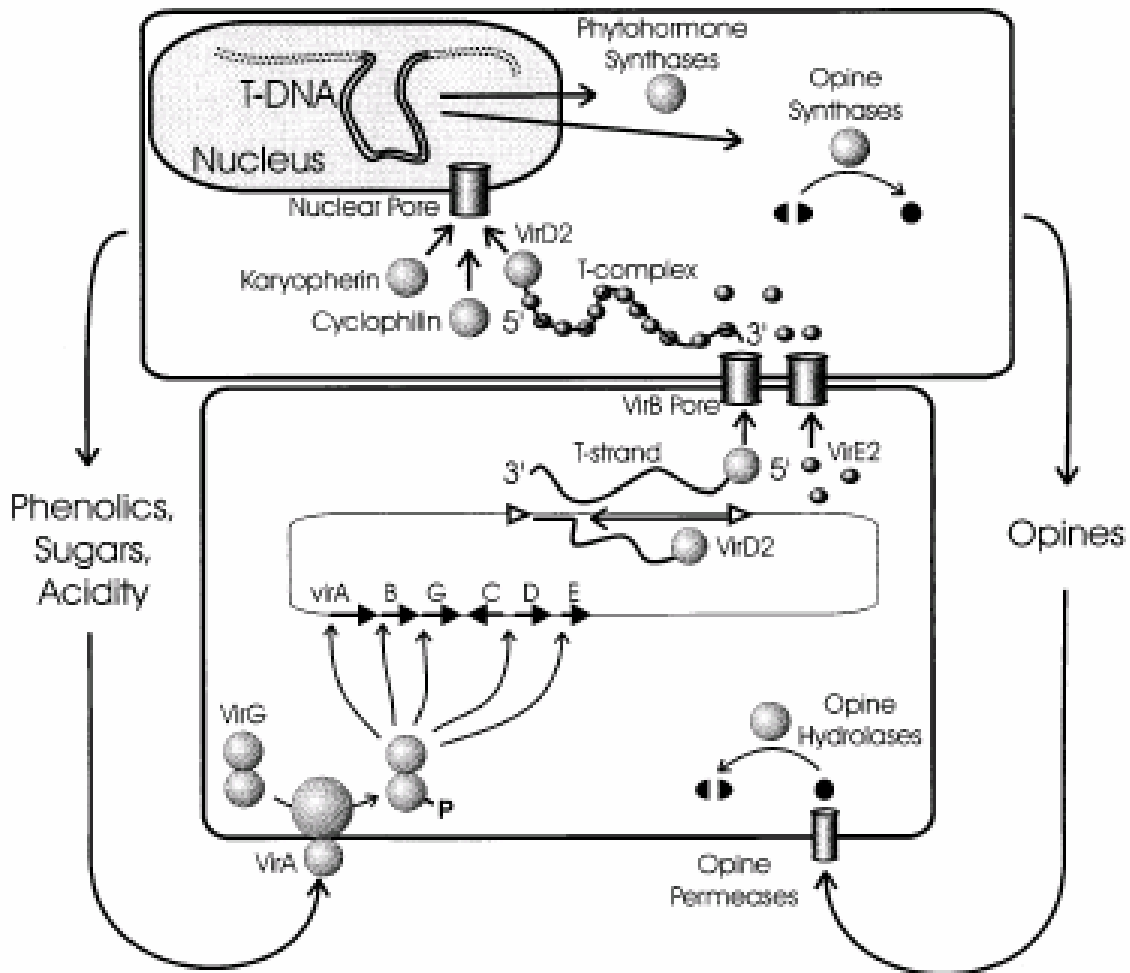


Intégration aléatoire dans le génome, plutôt régions transcrites

Possibilité d'avoir plusieurs copies, nature des tissus, de la souche

Tout les gènes de l'agrobactérie possèdent les éléments de régulation de la transcription, Pol II

En plus intégration de l'ADN-T dans génome de champignons, levure et en 2002 dans cellules humaines en culture par contact avec des agrobactéries



Le T-DNA cellulaire (cT-DNA) chez les Nicotianées

-Les hybrides *Nicotiana glauca* et *Nicotiana langsdorfii* produisent des tumeurs spontanées (White 1939)

détection de séquences similaires aux gènes *rol*, ORF13 et ORF 14 d'*Agrobacterium rhizogenes* dans le génome de *N. glauca*.

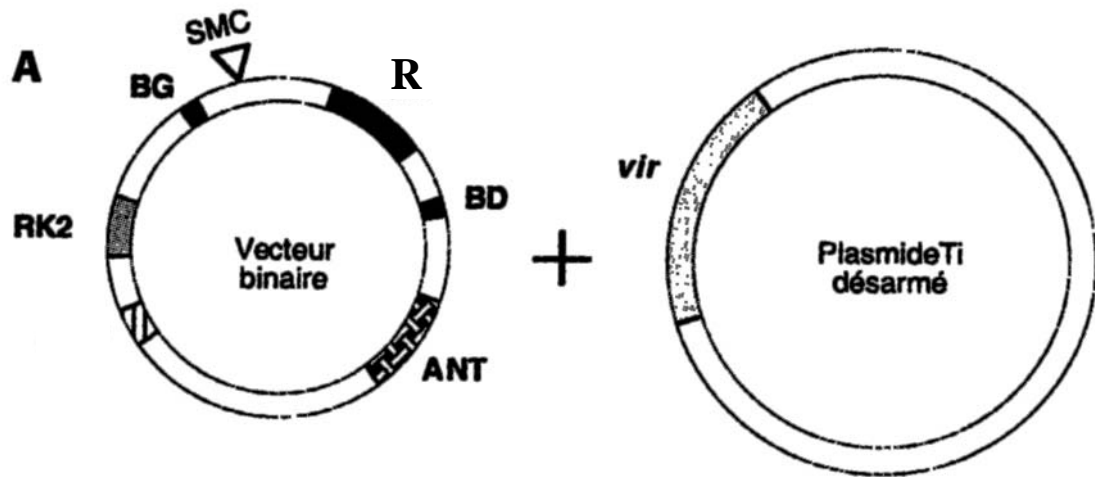
-Puis on détecte des séquences similaires au gène *rolC* chez *N. tabacum* (le tabac cultivé), elles proviennent du parent *N. tomentosiformis* ($N. tabacum = N. tomentosiformis \times N. glauca$), ce gène est transcrit donc potentiellement actif

⇒ transfert horizontal d'ADN entre les agrobactéries et plusieurs nicotianées primitives...

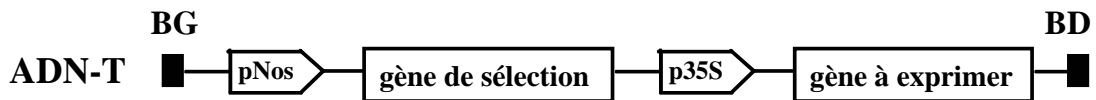
Combien d'autres cT-DNA????

La transformation génétique comme outil de biotechnologie

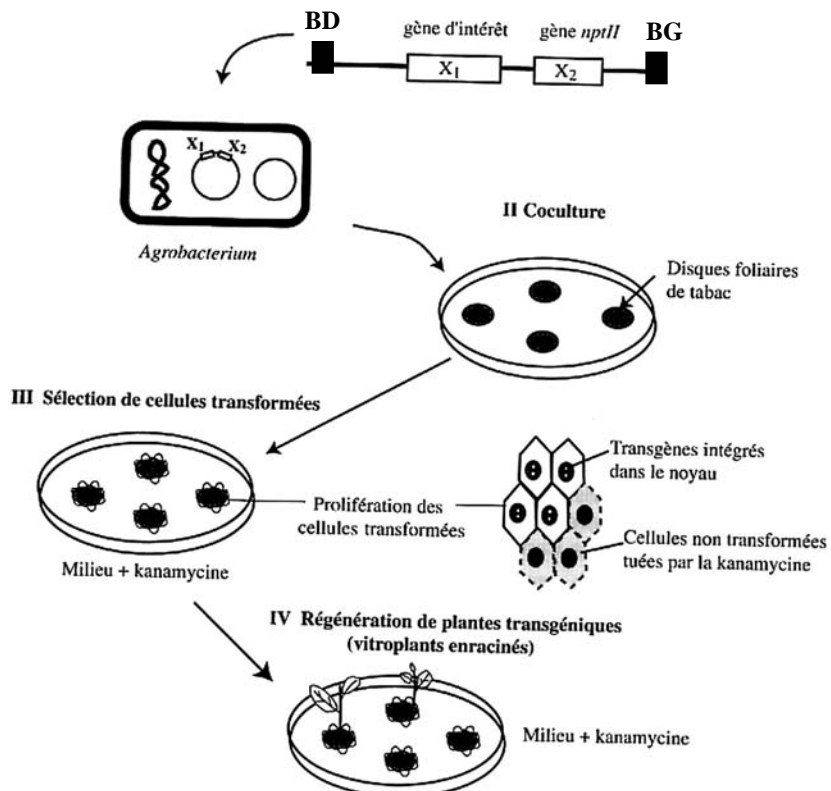
Système de transformation binaire



Structure d'un transgène

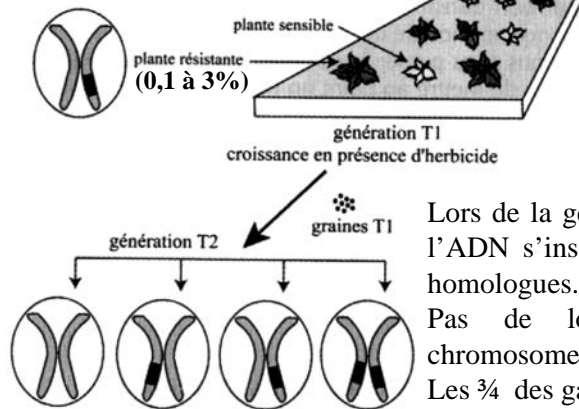
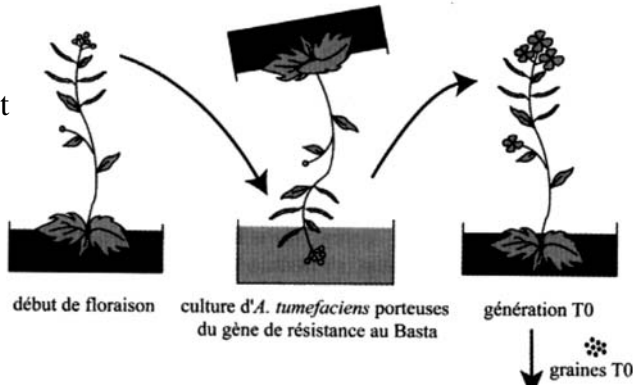


Les étapes de la transformation génétique du tabac



Transformation génétique d'*Arabidopsis thaliana* par infiltration

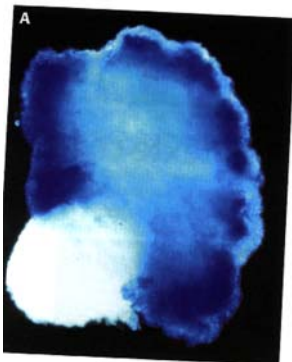
Stade préfloral
Donc au moment
de la formation
des ovules et du
pollen



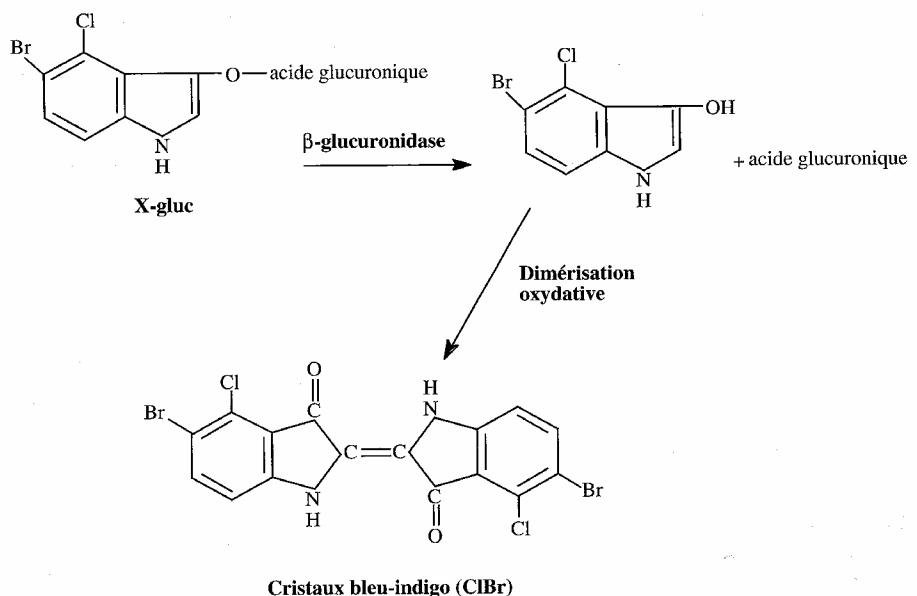
Intégration dans lignée
germinale

Lors de la génération d'une plante transgénique,
l'ADN s'insère dans un seul des chromosomes
homologues.
Pas de locus correspondant sur l'autre
chromosome -> hémizygote
Les $\frac{3}{4}$ des gamètes porteront le transgène

Les gènes marqueurs



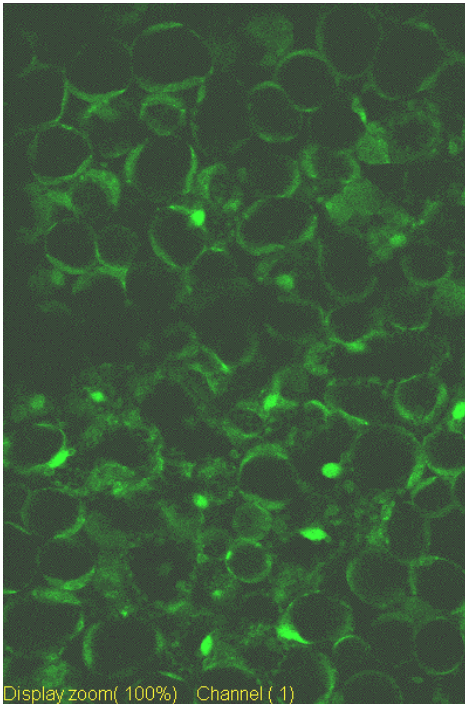
La B-glucuronidase de *E.coli* (GUS)



Les gènes marqueurs

GFP; Green fluorescent protein (*Aequora victoria*), protéine avec chromophore

Absorbion à 395 nm



Émission à 509 nm

Marquage des noyaux avec une fusion NLS-GFP dans une plante transgénique

Applications de la transgénèse végétale

Applications fondamentales

Etude des promoteurs

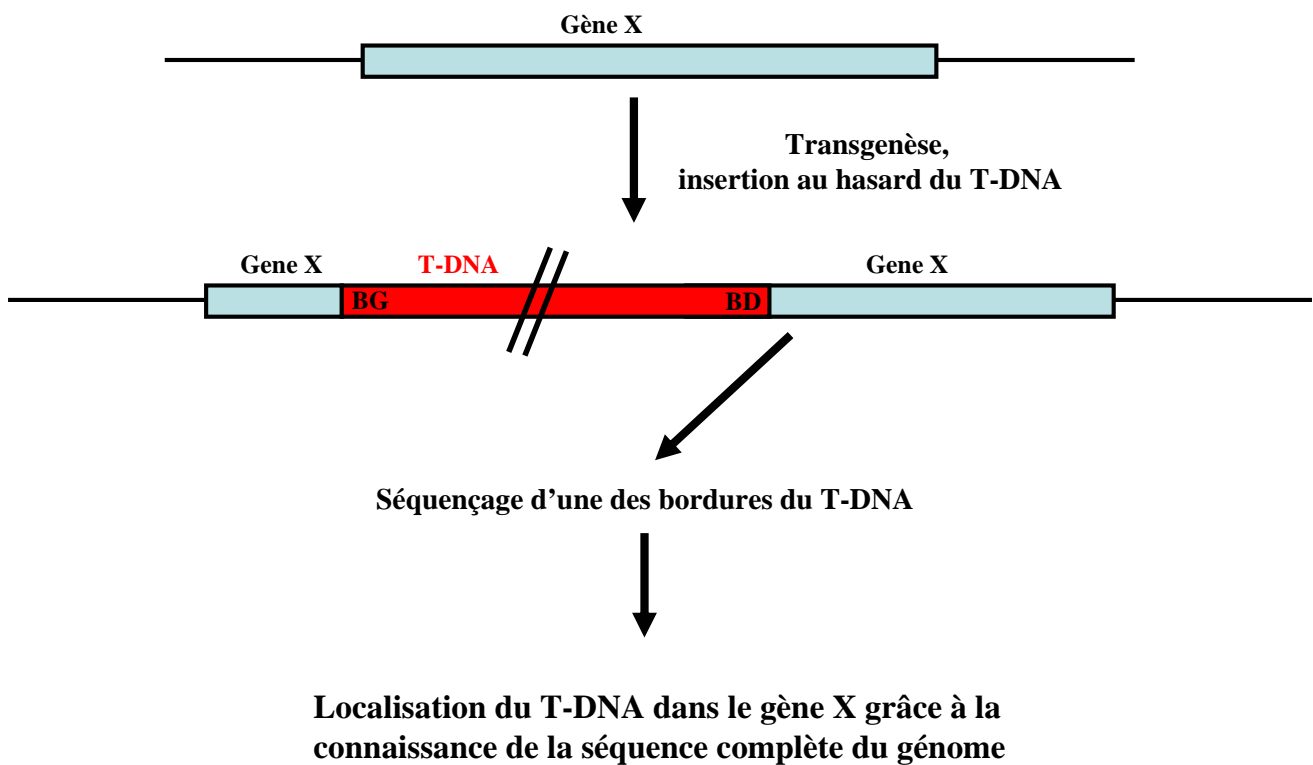
Etude de l'adressage des protéines

Recherche de la fonction des gènes par complémentation ou par modification de leur expression (sur ou sous (**RNAi**))

Production de banques de mutant d'insertions d'ADN-T

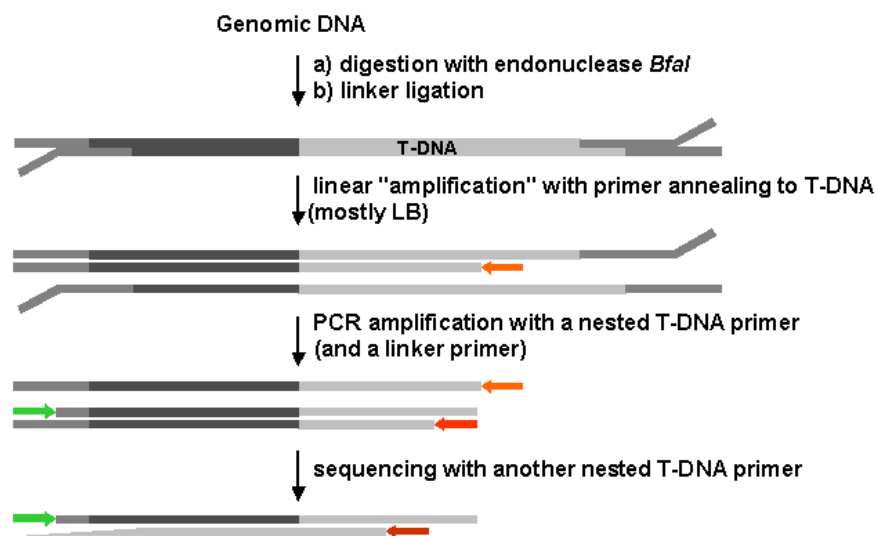
FST : Flanking Sequence Tags

Génération de banque de mutants d'insertion d'ADN de transfert



Production de banques de mutant d'insertions d'ADN-T

Sequencing of flanking sequence fragments



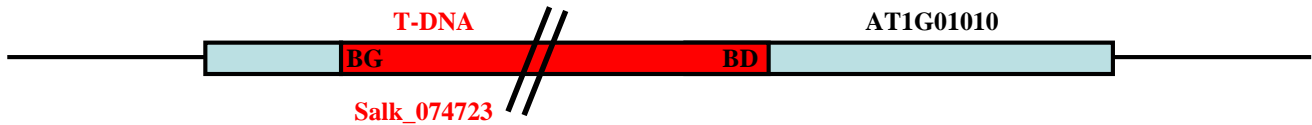
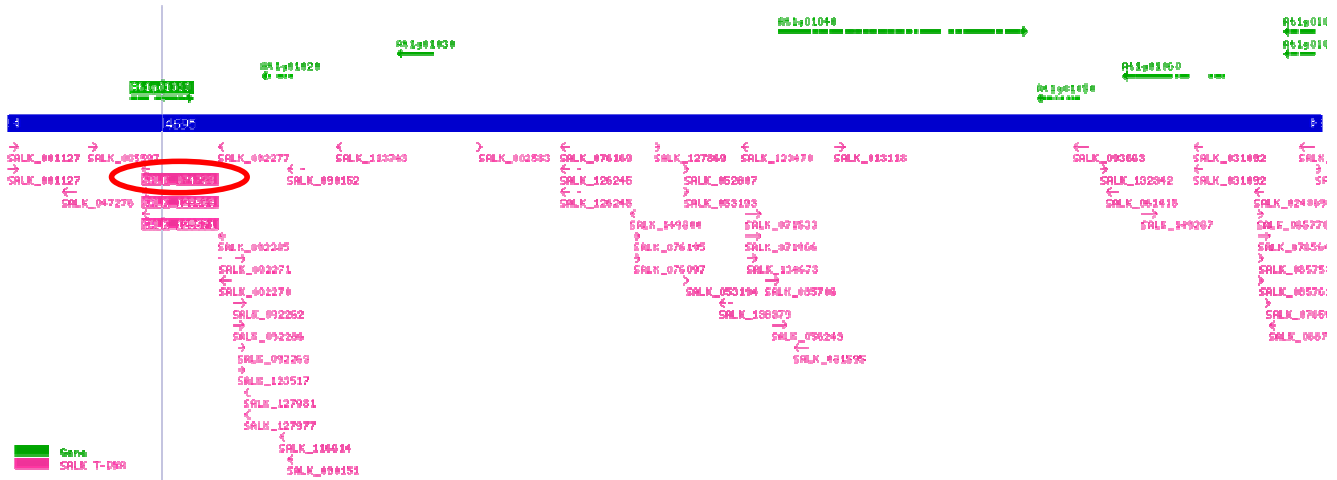
FST : Flanking Sequence Tags

Recherche de mutants dans banques de données de FST

Indentification d'un mutant d'insertion dans un gène d'intérêt

Recherche dans le gène At1g01010

Arabidopsis thaliana [AGI V5]
chr1 1 - 40001



Applications agronomiques

Résistance aux pathogènes

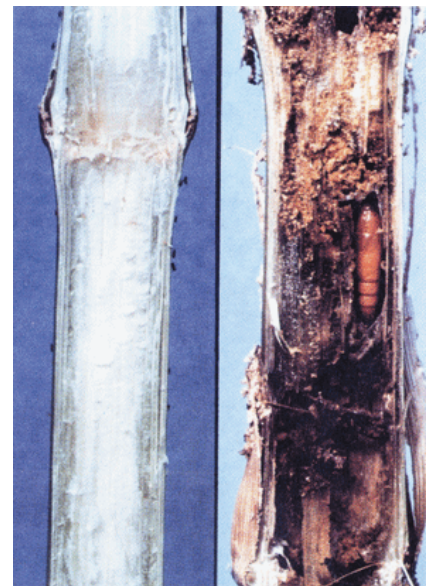
Résistance aux insectes

Endotoxine de *Bacillus thuringiensis* (Bt) contre larve de lépidoptère

- protoxine clivée dans l'intestin moyen de l'insecte par protéase + pH alcalin
- Toxine active
- se fixe à des sites de l'intestin
- ulcération, perte d'appétit
- Rupture des cellules, mort des larves

Moins d'insecticides.

Tomate, pomme de terre, coton, laitue, peuplier, maïs



Résistance aux pathogènes

Tolérance aux virus

Protéine de capsid

Protéine de mouvement

ARN interférence

Résistance aux herbicides

Résistance à la phosphinotrycine (BASTA)

Tolérance aux stress abiotiques

Salinité, acidité du sol, sécheresse, froid

Contrôle du mûrissement des fruits

Tomate, production d'éthylène → mûrissement

Blocage des gènes de synthèse de l'éthylène

Amélioration des qualités nutritionnelles

- Intervention sur la composition en acides aminés des protéines de réserve des graines, pour améliorer leur saveur, ou bien leur qualité nutritive
- Maïs, amidon (amylose/amylopectine), agents épaississants
- Introduction de gènes codant pour des enzymes du métabolisme lipidique -> modifier la longueur de la chaîne des acides gras ou la position ou le nombre de doubles liaisons, améliorant ainsi la qualité des huiles, à usage alimentaire ou non.
- Riz doré (golden rice)
carence en vitamine A (antioxydant), 400 millions de personnes (cécités, sensibilité accrue aux infections)
Introduction de 4 gènes → synthèse de B-carotène (précurseur de la Vit A)
- Réduction des teneurs en nitrate

APPLICATIONS INDUSTRIELLES

- Industrie papetière, papier à partir de cellulose du bois, Présence de lignine → très coûteux à éliminer et source de pollutions Modifications qualitatives et quantitatives
- Les plantes transgéniques peuvent devenir productrices par exemple d'élastomères et plastiques biodégradables
- Production de molécules d'intérêt pharmaceutique

les protéines animales dont les gènes ont été clonés et exprimés dans les bactéries, ou même les levures, ne subissent pas toujours après leur synthèse les modifications (glycosylations, etc.) nécessaires à leur activité biologique ; exprimées dans des plantes, modifications post-traductionnelles les rapprochant davantage des protéines natives.

Systèmes de culture de cellules végétales réels avantages par rapport à animales, substrat moins onéreux, pas de risque de contamination par un virus pathogène pour les animaux ou l'homme. protéines vaccinales fait actuellement l'objet de recherches approfondies; la perspective de ces travaux est bien entendu le développement de " vaccins comestibles " à usage humain, contre par exemple la carie dentaire, le choléra et le SIDA. Production d'anticorps dans les plantes, planticorps.

Quels aliments transgéniques trouve-t-on sur le marché international ?

Toutes les plantes génétiquement modifiées conçues pour avoir l'une des trois propriétés fondamentales suivantes : résistance aux insectes, aux infections virales et tolérance à certains herbicides.

Culture Caractéristique Territoires/pays où elle est homologuée

Maïs Résistance aux insectes, Tolérance aux herbicides (Afrique du Sud, Argentine, Canada, Etats-Unis d'Amérique, Union européenne, Argentine, Canada, Etats-Unis d'Amérique, Union européenne)

Soja Tolérance aux herbicides (Afrique du Sud, Argentine, Canada, Etats-Unis d'Amérique, Union européenne (pour la transformation seulement)

Colza Tolérance aux herbicides (Canada, Etats-Unis d'Amérique)

Chicorée Tolérance aux herbicides Union européenne (uniquement pour les croisements)

Courge Résistance aux virus Canada, Etats-Unis d'Amérique Pomme de Terre
Résistance aux insectes / tolérance aux herbicides (Canada, Etats-Unis)