Veille citoyenne d'information sur les OGM et les semences

Les techniques de transfert de gènes chez les végétaux

Par Inf'OGM Vincent Thizeau

Publié le 03/01/2002, modifié le 09/03/2026

Des plantes peuvent-être régénérées assez facilement à partir d'une cellule somatique. La cellule végétale est donc apparue comme l'unité fondamentale dans le processus de la création d'une lignée de végétaux transgéniques. Sa propriété de totipotence lui confère, in vitro, dans des conditions contrôlées, la capacité de régénérer une plante entière. En revanche, la paroi pectocellulosique cellulaire rigide (absente des cellules animales) constitue un obstacle au transfert de gène, qui est contourné par l'utilisation des bactéries du genre Agrobacterium possédant un système naturel de transfert de gènes aux cellules végétales (cf. fondement biologique de la transgenèse végétale). L'existence d'espèces végétales insensibles à cette bactérie a incité les chercheurs à mettre au point d'autres méthodes. Aussi, actuellement deux familles de techniques sont réalisées pour la transformation génétique de cellules végétales : l'une consistant à utiliser les propriétés de bactéries du sol du genre Agrobacterium, l'autre faisant intervenir des méthodes physiques ou chimiques qui permettent la pénétration de l'ADN directement dans les cellules végétales.

1 - La transformation de cellules végétales par Agrobacterium :

1.1 - L'exploitation du phénomène naturel. Les mécanismes moléculaires à la base des phénoménes naturels de transformation génétique par Agrobacterium s'apparentent finalement à ceux mis en jeu lors d'une conjugaison bactérienne (cf. la rubrique démarche de ce site) à ceci prés que le partenaire receveur est une cellule végétale eucaryote. Les gènes portés par l'ADN-T ne s'expriment pas dans Agrobacterium tumefaciens, mais seulement dans le noyau des cellules végétales ; présent sur le plasmide Ti, il porte des signaux de régulation de type eucaryote. Pour obtenir des plantes transgéniques, on utilise le fait qu'il soit possible de supprimer les oncogènes (fonction ONC) de l'ADN-T, ce qui a pour effet de le désarmer, c'est à dire de lui ôter tout caractère pathogène, tout en conservant la possibilité d'obtenir le transfert de gènes (mais cette fois-ci ceux que l'on veut) depuis une bactérie vers un noyau de cellule végétale.

1.2 - Les conditions du succés de la transgenèse végétale. Le succés de la transgenèse végétale repose sur la conjonction de plusieurs conditions qui doivent être réunies simultanément : - pénétration de l'ADN étranger jusque dans les noyaux des cellules végétales ; - intégration dans le génome de l'hôte, c'est à dire dans un des chromosomes afin que le transgène puisse se répliquer et devenir stable au sein du génome nucléaire et ainsi être transmis aux cellules filles ; - aptitude des transgènes à être exprimés, suite à la transcription en ARN dans le noyau et à la traduction en

protéine dans le cytoplasme ; - sélection et régénération de plantes entières à partir des cellules génétiquement modifiées. La sélection s'éffectue grâce à un gène marqueur (aussi présent sur l'ADN-T) conférant la résistance à un antibiotique toxique (ou à un herbicide) pour la cellule végétale transformée. Pour être qualifiée de transgénique il faut que toutes les cellules de la plante posséde le transgène sinon, il s'agit d'une plante chimère. C'est en 1983 que toutes ces conditions ont été réunies pour la première fois. Une équipe de chercheurs belges a obtenu des tabacs transgéniques exprimant un gène artificiel les rendant résistants à un antibiotique, la kanamycine. Insérer le gène dans Agrobacterium Insérer Agrobacterium dans les cellules de la plante en culture. Il transmet le gène à la plante. On obtient une plante génétiquement modifiée.

1.3 - L'obtention de tabac transgénique ou comment, expérimentalement, transférer et permettre l'expression d'un gène étranger dans une plante entière ? De manière simplifiée, on peut décrire la suite des trois étapes suivantes dans les plants de tabac :
Etape 1 : réalisation d'un gène artificiel (ou composite), construit en laboratoire et associant trois parties : - la séquence codante d'un gène bactérien (séquence codante de la néomycine phosphotransférase ou NPT qui confère la résistance à un antibiotique, la kanamycine) ; - un promoteur de l'ADN-T d'Agrobacterium ; - un terminateur de ce même ADN-T. Les deux dernières parties constituent des parties du plasmide Ti de la bactérie et sont nécessaires pour pouvoir faire fonctionner le gène associé dans un environnement nouveau, la cellule végétale. Le gène ainsi construit est alors introduit dans un plasmide Ti « désarmé » (ne comportant plus de gènes tumoraux), lui-même réintroduit dans une bactérie Agrobacterium.
Etape 2 : incubation de la bactérie modifiée avec des fragments découpés de feuille de tabac ; au niveau de la coupure, les cellules végétales sont blessées, ce qui stimule le système naturel de transfert de gènes d'Agrobacterium. Les fragments de feuilles sont ensuite incubés en présence de kanamycine et seules les cellules transformées prolifèreront et donneront des cals.
Etape 3 : culture de ces cals sur des milieux appropriés contenant des phytohormones, certaines des cellules donneront des bourgeons, qui s'enracineront ensuite pour régénérer des plantes entières (propriété de totipotence des cellules végétales somatiques). Afin de vérifier que les plantes régénérées sont bien transformées, on séme leur graines (obtenues par autofécondation) qui, semées dans un milieu contenant de la kanamycine, donnent - soit des plantes dépourvues de chloroplastes (la kanamycine interfére avec le développement des chloroplastes). Ces plantes sensibles sont blanches et leur développemnt est alors arrêté (photosynthèse impossible). Elles meurent. - soit des plantes chlorophylliennes normales. Dans ce cas, ces dernières sont résistantes à l'antibiotique, car elles fabriquent l'enzyme néomycine-phosphotransférase qui annule la toxicité de la kanamycine (processus de détoxification) et assure la mise en place de chloroplastes fonctionnels nécessaires à la poursuite du développement. Statistiquement, 1/4 des plantes ne possédent pas le gène de résistance ; c'est la proportion attendue pour un gène quelconque (cf. lois de Mendel). Ce gène introduit se conduit comme n'importe quel autre gène : il fait alors partie du patrimoine génétique de la plante que l'on qualifiera de transgénique (cf. figure 1). Des analyses moléculaires au niveau de l'ADN sont aussi pratiquées pour vérifier le transfert du gène. Figure1 - L'exemple du transfert du gène de résistance à la kanamycine dans une cellule de plant de tabac. 2 - Le transfert direct de gènes : Parallélement aux recherches menées avec Agrobacterium, se sont développées, à l'origine essentiellement sur cellules animales (cf. techniques de transgenèse animale sur ce site), des techniques de transfert direct d'ADN, par des méthodes chimiques, physiques ou faisant appel à des impulsions électriques. Une fois éprouvées sur des cellules animales, ces méthodes ont été testées sur des cellules végétales débarrassées de leur paroi rigide, ou protoplastes. Grâce à ces techniques, à condition que l'ADN atteigne le noyau, on peut obtenir son expression, c'est à dire la synthèse de la protéine codée par les gènes qu'il renferme, à condition toutefois (de même que pour les méthodes faisant appel à Agrobacterium) que les gènes transférés puissent s'exprimer dans la cellule qui vient de les recevoir.

2.1 - Transformation de protoplastes : Les techniques de transformation mises au point sur les cellules animales ont pu être appliquées sur des protoplastes : par méthode chimique, en utilisant le polyéthyléneglycol (PEG), une molécule capable d'induire la destabilisation de la membrane plasmique et qui permet le transfert d'ADN à travers celle-ci ; par méthode physique, en réalisant la fusion entre les protoplastes et des liposomes (vésicules artificielles de phospholipides encapsulant l'ADN à transférer) ; par méthode faisant appel à des impulsions électriques, l'électroporation des protoplastes, technique efficace et une des plus simples à mettre en oeuvre. Elle consiste à soumettre un mélange de protoplastes et d'ADN à une série de chocs électriques de courte durée et de tension élevée. Le champ électrique provoque la destabilisation de la membrane plasmique par polarisation des phospholipides qui la constituent et induit alors la formation de pores au travers desquels les molécules d'ADN peuvent transiter. Si le choc électrique n'a pas été trop violent, le phénomène est réversible et la membrane reprend ensuite son état initial, laisant le protoplaste parfaitement viable. Limites : les techniques appliquées aux protoplastes végétaux sont actuellement applicables uniquement chez les espèces dont on maîtrise la mise en culture et la régénération des plantes à partir des protoplastes. Intérêt : c'est grâce à ces techniques sur la transformation des protoplastes que des céréales de grande culture, monocotylédones, telles que le riz, le maïs ou l'orge ont été transformées pour la première fois. Effectivement, ces plantes étaient réputées insensibles à Agrobacterium. N.B. : les progrés des méthodes de culture in vitro font que maintenant des plantes comme le riz sont aussi transformées à l'aide d'Agrobacterium.

2.2 - Transformation directe de cellules, de tissus, ou d'organes : Il s'agit, dans ces différents cas de palier aux limites de la transformation de protoplastes pour les espèces dont on ne maîtrise pas la régénération des plantes en culture in vitro. Aussi, dans différents cas, on peut forcer la pénétration de l'ADN à travers la paroi pectocellulosique des cellules végatales. La technique consiste à utiliser un canon à particules. Le principe consiste à projeter sur le tissu à transformer de toute petites billes d'or ou de tungstène enrobés d'ADN. Ces billes projetées on suffisament d'énergie cinétique pour traverser la paroi et la membrane des cellules sans leur infliger de dommages irréparables. On peut ainsi introduire de l'ADN dans des tissus qui vont directement générer une plante comme des embryons ou des méristèmes. N.B. : d'autres techniques de transfert direct sont en cours d'étude : la transformation du pollen, la sonication de tissus, la microinjection d'ADN dans les tissus conducteurs ou encore l'imbibition d'embryons et même des systèmes de fibres carbones où l'ADN est adsorbé, sont en cours d'étude. On sait maintenant réaliser la transformation d'organites (comme les chloroplastes) et utiliser des virus comme vecteur. A l'heure actuelle, on peut considérer que la plupart des plantes de grande culture (soja, maïs, blé, riz, coton tournesol, pomme de terre, colza, tomate) sont accessibles à la transformation génétique. Transformation par biolistique Enduire les particules d'or avec une solution d'ADN. Introduire par un « tir » les ensembles particules d'or-ADN dans des cellules de plantes en culture. Les gènes s'intègrent aux chromosomes de la plante. On obtient une plante génétiquement modifiée.

Source des schémas :
http://svt.scola.ac-paris.fr/ressource/outils/ogm/page4.html
Relu par : Christophe Robaglia Laboratoire du métabolisme carboné, département d'écophysiologie végétale, CEA.

Adresse de cet article : https://infogm.org/les-techniques-de-transfert-de-genes-chez-les-vegetaux/