

Le transfert direct



Malgré les nombreux avantages que présente le système de transfert par *Agrobacterium*, deux limites importantes sont apparues :

- Toutes les plantes ne sont pas sensibles aux agrobactéries, notamment les monocotylédones (parmi lesquelles on compte nombre de plantes d'intérêt agronomique). De plus, même chez les dicotylédones, des spécificités hôte-bactérie assez strictes restreignent le champ d'application de cette technique.
- L'obligation de passer par la culture des tissus et la régénération des plantes *in vitro* représente une contrainte importante dans les groupes des espèces où ces méthodes sont difficiles à maîtriser.

•

•

Pour toutes ces raisons, des stratégies alternatives dites de transfert direct ont été développées.

Ces techniques consistent à forcer l'entrée massive d'ADN dans la cellule végétale, suite à cet événement, certaines cellules intègrent dans leurs génomes des fragments de cet ADN étranger.



La stratégie classique consiste à cloner le gène à transférer dans un vecteur de clonage qui possèdent une origine de réplication fonctionnelle chez *Escherichia coli* et qui permet donc la production rapide d'une grande quantité de ce plasmide.



Selon la technique, l'ADN recombinant est utilisé :

- En solution : Transformation des protoplastes, électroporation.
- Fixé sur des microbilles : La biolistique.

1- Transformation des protoplastes :

Protoplaste:

Définition:

Les protoplastes sont des cellules végétales, non sexuelles, sans parois, obtenues expérimentalement par digestion de la paroi pecto-cellulosique.

Pour obtenir ces protoplastes et les maintenir en vie, il faut les préparer et les conserver dans un milieu hypertonique qui plasmolyse les cellules et leur permet de ne pas éclater par entrée d'eau en l'absence de paroi.



1- Transformation des protoplastes :

Principe de la technique:

Déstabilisation de la membrane de la cellule par des agents chimiques ou physiques pour permettre l'entrée de l'ADN.

Cette perturbation doit être suffisamment **brève** pour que la membrane puisse reprendre son état initial et que le protoplaste reste viable.



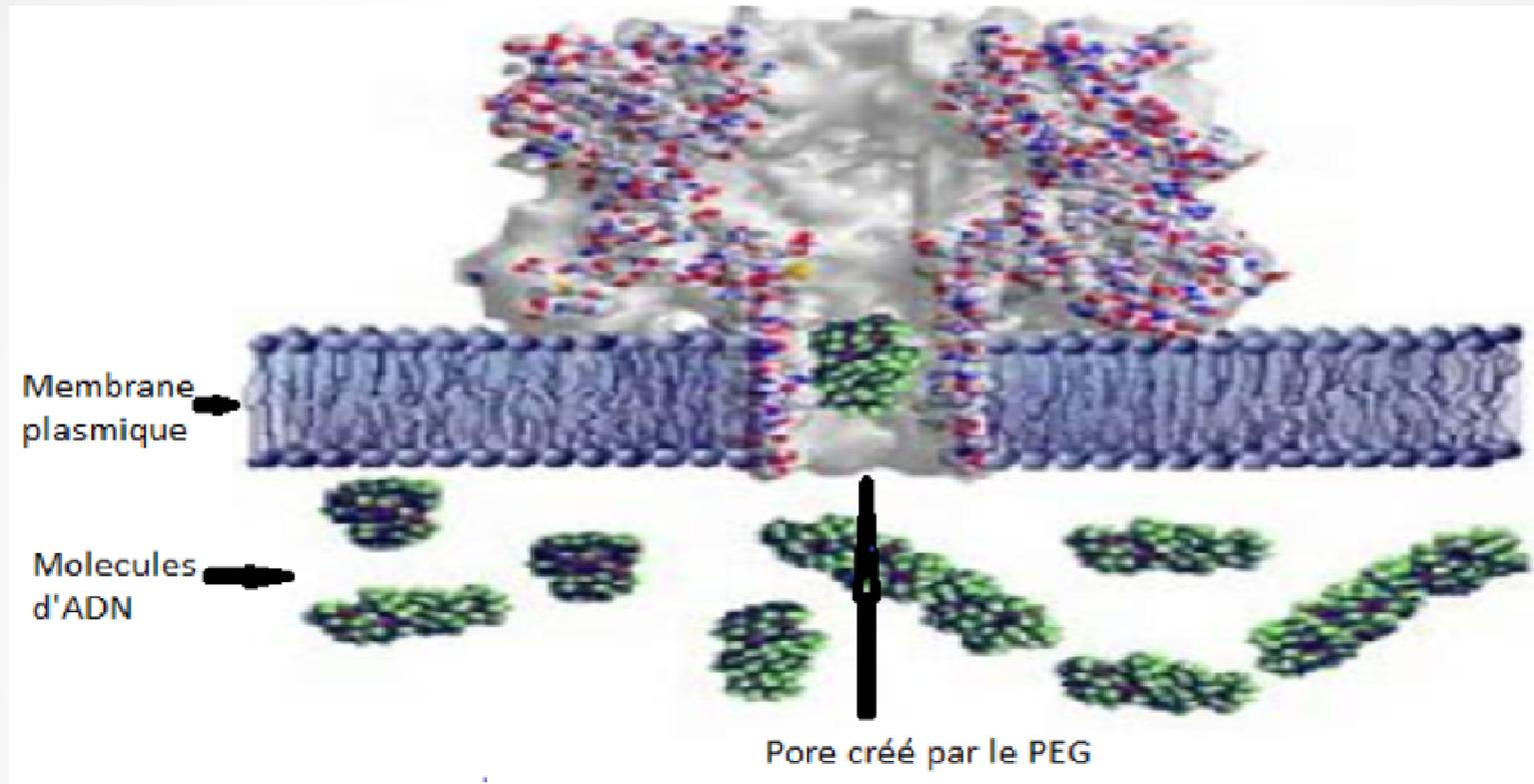
1- Transformation des protoplastes :

1- 1- Par des agents chimiques :

Le PolyEthylèneGlycol (**PEG**) : Molécule non toxique et de haut poids moléculaire qui induit des perturbations de la membrane autorisant l'entrée de l'ADN dans la cellule.



1- Transformation des protoplastes :



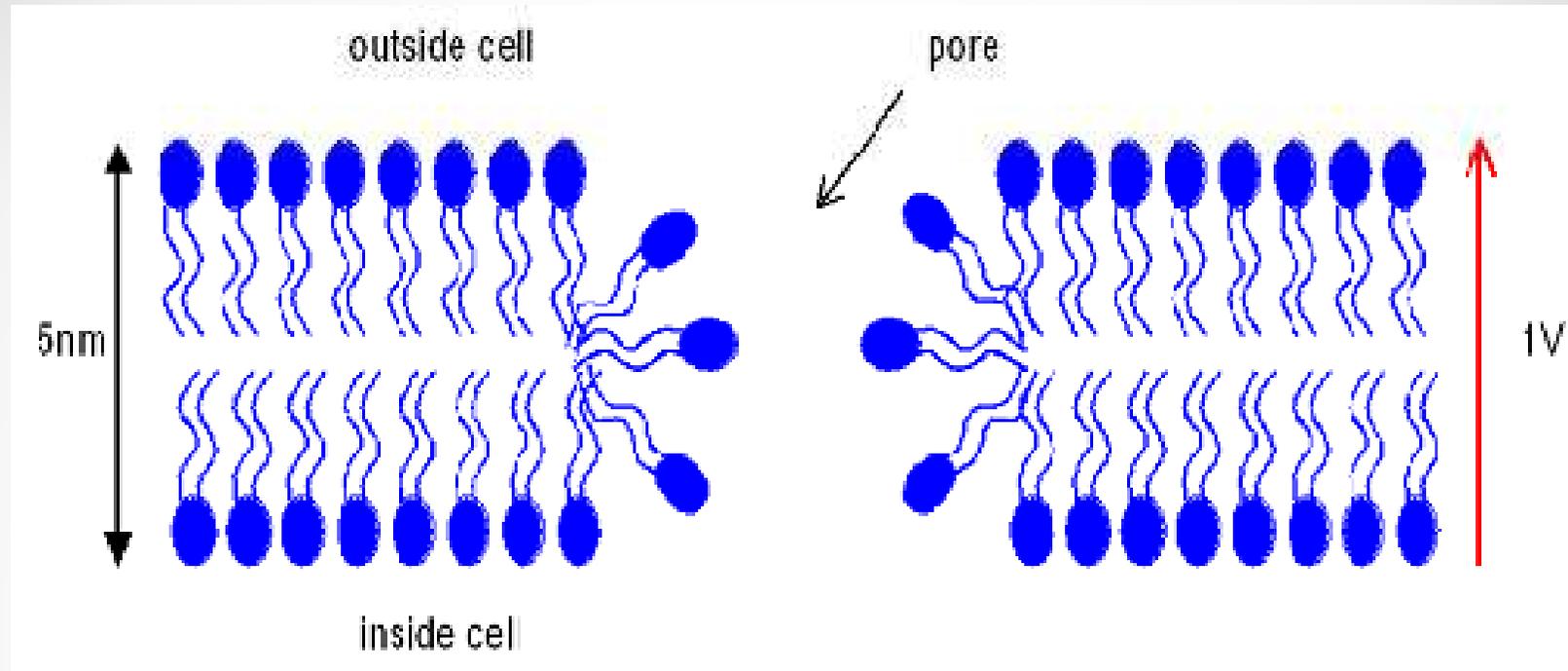
Les protoplastes sont mis en suspension dans une solution contenant le PEG et le plasmide à introduire, laissés en contact quelques minutes puis rincés et mis en culture.

1- Transformation des protoplastes :

1- 2- Par les agents physiques: **l'électroporation**

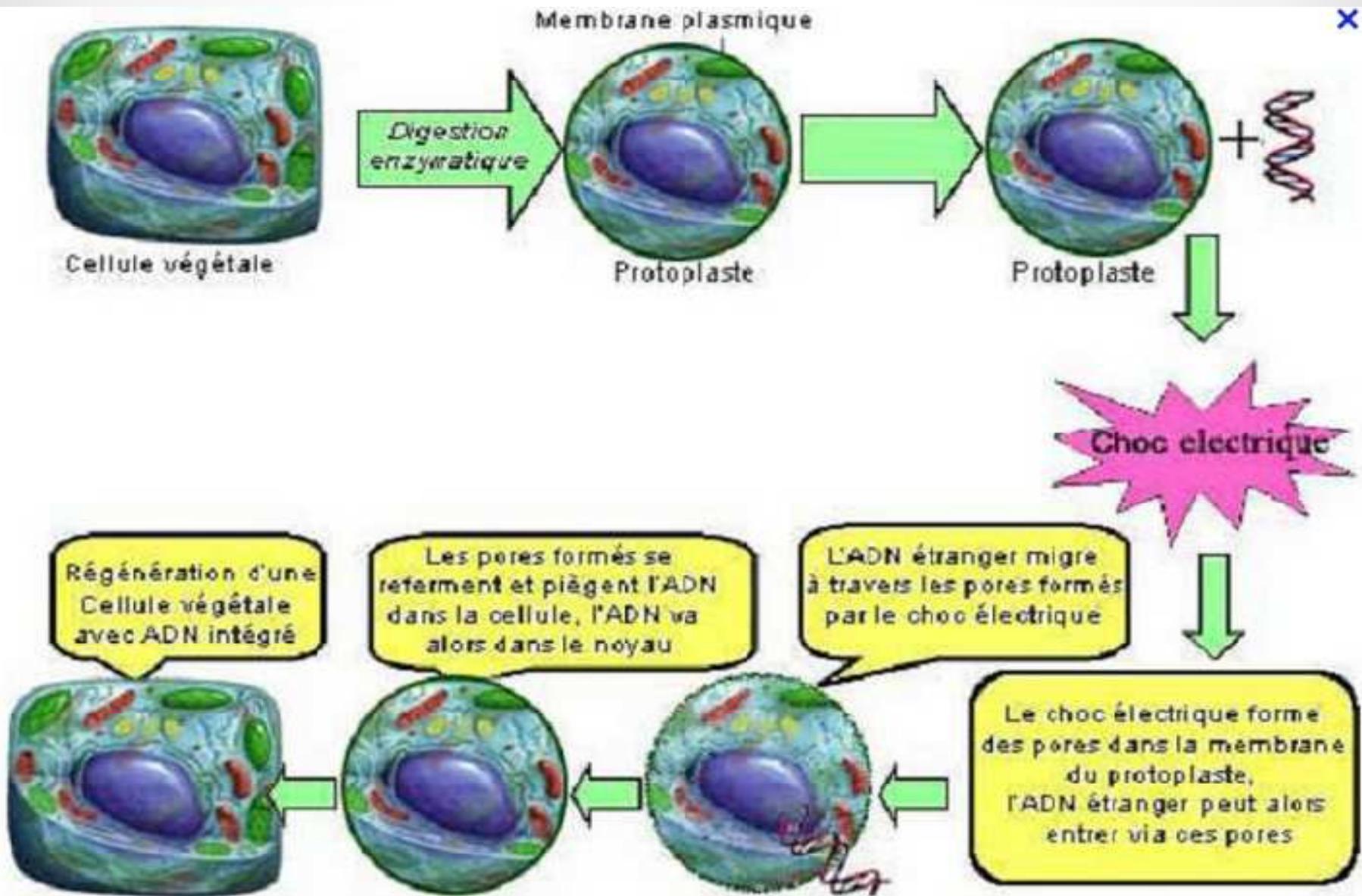
Les protoplastes mélangés à de l'ADN sont soumis à une série de chocs électriques de courte durée et de tension élevée.





Les membranes plasmiques sont alors déstabilisées et la polarisation des phospholipides qui s'ensuit provoque la formation de pores à travers desquels les molécules d'ADN peuvent transiter. Les protoplastes sont ensuite mis en culture et sélectionnés grâce au gène de résistance porté par le plasmide transféré.

1- Transformation des protoplastes :



1- Transformation des protoplastes :

L'avantage de cette technique (transformation de protoplastes) est qu'elle surmonte le problème de l'insensibilité de certaines plantes aux agrobactéries, mais le passage par une étape de régénération d'une plante entière reste inévitable.



2- La Biolistique : Bombardement de particules

Principe :

Enrober des billes de métal (or ou tungstène) avec de l'ADN puis projeter ces billes sur l'explant avec suffisamment d'énergie pour qu'elles traversent la paroi et la membrane des cellules.

La faible taille des billes assure l'absence de dommages irréversibles à la cellule.



2- La Biolistique : Bombardement de particules

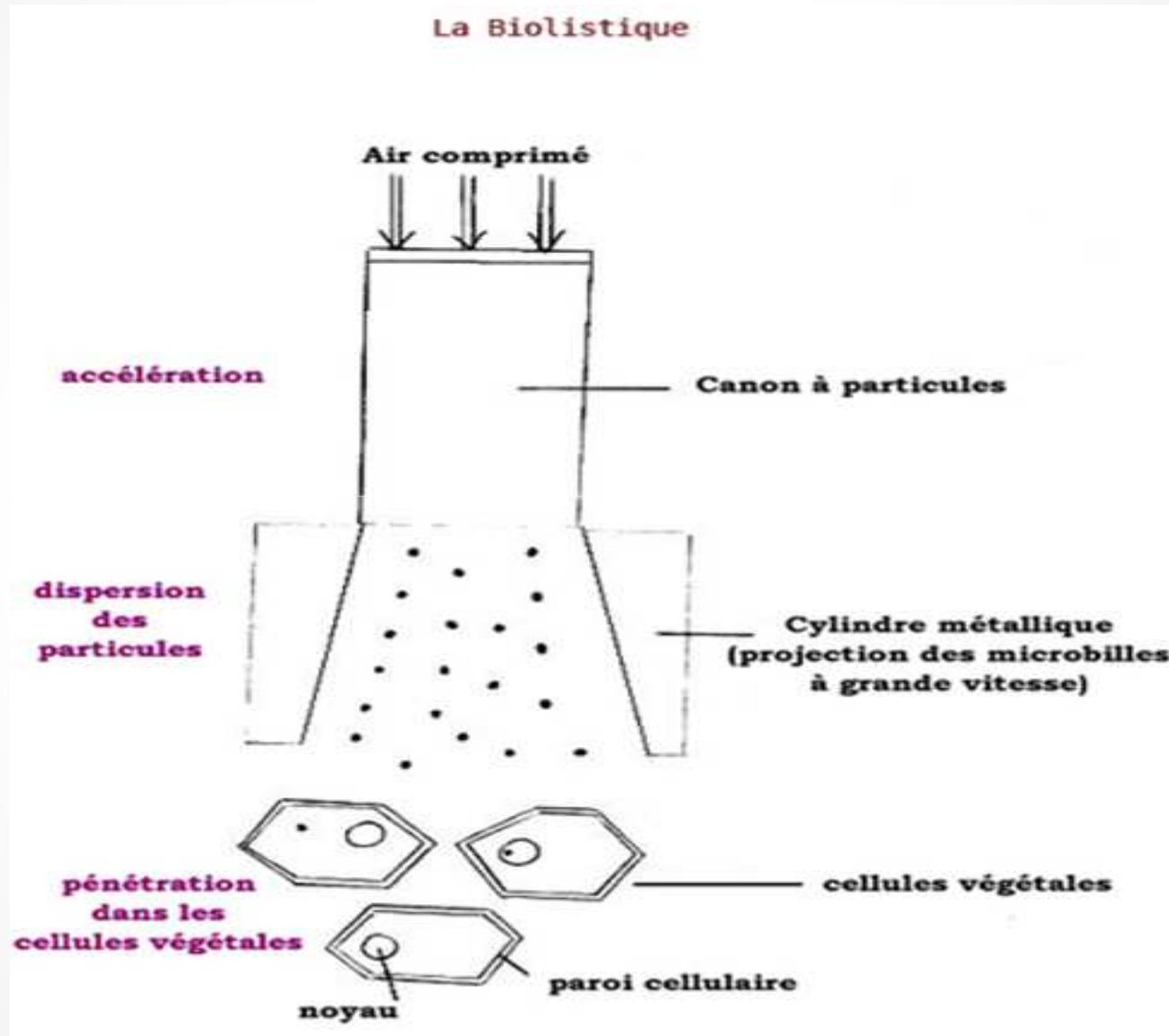


Fig. Canon à particules

2- La Biolistique : Bombardement de particules

Ainsi, on peut introduire de l'ADN dans des embryons ou des méristèmes (cellules en division à l'extrémité des racines) qui vont directement générer une plante.



2- La Biolistique : Bombardement de particules

Cette méthode de bombardement permet de contourner les principales difficultés rencontrées dans les expériences de transformation à savoir :

- La sensibilité aux agrobactéries.
- La maîtrise des protocoles de régénération.



2- La Biolistique : Bombardement de particules

Par exemple, dans la classe des monocotylédones, le facteur limitant est la quasi-insensibilité à l'infection par les agrobactéries.

En revanche, des systèmes de régénération à partir de différents tissus sont bien maîtrisés.

La biolistique permet de réaliser la première étape.



2- La Biolistique : Bombardement de particules

Dans d'autres cas, chez les légumineuses par exemple, l'inoculation par les agrobactéries est réalisable de façon satisfaisante mais la néoformation de plantes à partir de tissus n'est pas rentable.

La solution autorisée par la biolistique est l'exploitation du développement naturel de la plante.



2- La Biolistique : Bombardement de particules

Chez d'autres espèces comme le tournesol, c'est la coïncidence entre l'intérêt agronomique du génotype et l'aptitude à la régénération qui est difficile à obtenir.

Là encore la biolistique peut s'avérer être un outil précieux.



2- La Biolistique : Bombardement de particules

Exemple d'espèces transformées par biolistique

Plantes	Tissu-cible	Références
Soja	Méristèmes	Christou <i>et al.</i> , 90
Arachide	Méristèmes	Brar <i>et al.</i> , 92
Haricot	Méristèmes	Russell <i>et al.</i> , 93
Mais	Suspensions cellulaires Suspensions cellulaires Embryons immatures	Gordon-Kamm <i>et al.</i> , 90 Fromm <i>et al.</i> , 90 Koziel <i>et al.</i> , 93
Riz	Embryons immatures	Christou <i>et al.</i> , 91
Blé	Embryons immatures et cals embryogènes Embryons immatures	Vasil <i>et al.</i> , 92 Weeks <i>et al.</i> , 93
Orge	Embryons immatures cals embryogènes	Wan et Le Moux, 94
Avoine	Cals embryogènes	Sommer <i>et al.</i> , 92
Canne à sucre	Cals embryogènes	Bower et Birch, 92
Coton	Méristèmes	Mc Cabe et Martinell, 93
Peuplier	Suspensions cellulaires embryogènes	Dayton <i>et al.</i> , 92
Epicéa	Cals embryogènes	Elis <i>et al.</i> , 93
Tournesol	Méristèmes apicaux	Bidney <i>et al.</i> , 93
Tabac	Feuilles, suspensions cellulaires	Tomes <i>et al.</i> , 90
Papaye	Embryons, hypocotyles	Fitch <i>et al.</i> , 90

2- La Biolistique : Bombardement de particules

Un autre intérêt de cette technique est la transformation d'organelles : La transformation du chloroplaste.

Cette technologie est spécialement importante dans la biotechnologie notamment de ce qui est de la biosécurité.

Comme le génome chloroplastique est à transmission maternelle, la dissémination de pollen issu de plante dont la transgénése a visé le génome chloroplastique ne présente aucun danger pour l'environnement.

