



HAL
open science

La caméline, une plante modèle pour la recherche translationnelle

Mark Tepfer, Bertrand Dubreucq, Jean-Denis Faure

► **To cite this version:**

Mark Tepfer, Bertrand Dubreucq, Jean-Denis Faure. La caméline, une plante modèle pour la recherche translationnelle. *Biofutur*, 2016, 380, pp.38-41. hal-01529235

HAL Id: hal-01529235

<https://agroparistech.hal.science/hal-01529235>

Submitted on 31 May 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

La caméline, une plante modèle pour la recherche translationnelle

Mark Tepfer, Bertrand Dubreucq et Jean-Denis Faure

Institut Jean-Pierre Bourgin,
Inra, AgroParisTech, CNRS, Saclay Plant Sciences,
Université Paris-Saclay,
Versailles

En biologie végétale, la recherche translationnelle vise à accélérer la valorisation de découvertes scientifiques réalisées à partir de plantes modèles, au bénéfice de plantes d'intérêt agronomique. Dans ce domaine, la caméline est un outil particulièrement efficace : génétiquement proche de l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*, elle permet d'évaluer simplement de nouveaux caractères associés aux plantes oléoprotéagineuses.

Les enjeux agronomiques associés aux oléoprotéagineux sont multiples, essentiellement liés à l'huile (extractibilité, rendement, qualité) et au tourteau de pressage, riche en protéines, utilisé pour l'alimentation animale. Depuis maintenant trente ans, et plus encore depuis la publication de la séquence du premier génome végétal en 2000, *Arabidopsis thaliana* a été une plante modèle de choix pour la recherche fondamentale et la production de connaissances (petit génome, faible taille, grand nombre de graines produites, transformation génétique¹ aisée) (Figure 1). Mais le transfert de ces connaissances à d'autres oléoprotéagineux ne se révèle pas toujours simple, du fait de différences, même faibles, avec les plantes cultivées (génomés complexes, cycles de vie longs, récalcitrance à la transformation génétique).

La caméline (*Camelina sativa*) s'avère être un outil particulièrement intéressant pour l'évaluation des caractères agronomiques associés aux plantes oléoprotéagineuses, et ce, pour plusieurs raisons : son génome présente une très forte similitude avec celui d'*Arabidopsis thaliana* ; son cycle de vie court permet d'obtenir plusieurs générations par an ; la relative abondance ainsi que la taille de ses graines offrent la possibilité de travailler avec des plantes individuelles ; son rendement et son profil en huile sont intéressants ; son contenu en protéines favorise la valorisation du tourteau de pressage ; enfin, comme *A. thaliana*, le processus de transformation de la caméline est simple et permet de générer de nombreux transformants afin de valider le transfert de connaissances (Figure 2) (1). Ces avantages se traduisent par des tailles de plante et de graine intermédiaires entre le colza et *A. thaliana* (figure 1). En outre, avec des variétés d'hiver et de printemps, la caméline est adaptée aux conditions climatiques européennes et elle est peu exigeante en intrants pour la culture.

Produire et tester de nouvelles variétés

Afin de profiter au mieux des avantages de la caméline pour la recherche translationnelle, il est utile d'optimiser toutes les étapes du processus, afin de créer un véritable *pipeline* de transformation génétique. La mise en place d'une structure de production et de validation de lignées efficaces est importante si l'on veut tester de nombreux transgènes avec de multiples combinaisons. L'encombrement des serres devient alors un point de gestion important. Pour chaque transformation, il est nécessaire d'obtenir quelques dizaines de transformants initiaux T1. Les analyses de phénotypage à la génération suivante (T2) doivent permettre de

¹ * La transformation génétique ou transgénése consiste en l'introduction d'une construction génétique (ADN) dans le génome d'un organisme vivant.

sélectionner les quelques lignées les plus prometteuses. Pour une culture à plus grande échelle à partir de la génération qui va fixer le caractère (T3), il est ensuite possible de se focaliser sur une ou deux lignées élites, qui seront comparées au témoin non modifié.

À Versailles, le processus complet, allant de la conception du projet à l'évaluation du phénotype des homozygotes de génération T2, peut se réaliser en moins d'une année. Ce délai est nettement plus court que pour la transformation génétique de toute autre espèce cultivée.

La conception du projet

Les laboratoires foisonnent d'idées de modifications génétiques à tester, basées sur les connaissances issues notamment des études réalisées sur *A. thaliana*. Pour la transformation de la caméline, les **outils moléculaires comme les plasmides** adaptés à la transformation via *Agrobacterium* sont tous utilisables, mais il est important d'inclure un gène qui code un marqueur permettant la sélection des transformants. Pour la caméline, l'expression d'une protéine fluorescente, DsRed ou GFP par exemple, permet un criblage simple et non destructif des graines portant les transgènes associés (figure 2c). Elle autorise aussi une analyse immédiate de la ségrégation du transgène et permet ainsi de gagner une génération pour sélectionner des plantes sans transgène – dans des stratégies utilisant la technologie CRISPR/Cas9 pour éditer des gènes par exemple.

Transformation par trempage floral sous vide

Quelle que soit l'espèce végétale, l'efficacité de la transformation génétique dépend du stade de développement et de l'état physiologique des plantes. Pour la caméline, cultivée à dix plantes par pot, l'état approprié, soit le début de floraison, est atteint un peu plus d'un mois après la mise en culture (figure 2a).

Le simple trempage des pointes des hampes florales dans une suspension d'*Agrobacterium* permet l'obtention de transformants (figure 2b), mais l'efficacité est bien meilleure si les agrobactéries sont infiltrées sous vide (40 mBar, 5 minutes). Pour faciliter l'infiltration au bon stade – les camélines ont alors un bon mètre de hauteur –, un **caisson permettant de placer les plantes sous vide et donc de favoriser l'infiltration bactérienne** est utilisé, comme chez *A. thaliana*.

Criblage par fluorescence

Il suffit ensuite de laisser pousser les plantes jusqu'à maturation des graines. La sélection des graines T1 transformées (expression du gène marqueur *DsRed*) peut se faire avec une simple loupe binoculaire à fluorescence, mais l'accumulation du marqueur est souvent visible à l'œil nu (figure 2c). À ce stade, on ne sait rien de l'efficacité des transgènes insérés, mais pour certaines modifications souhaitées, par exemple la modification de la composition lipidique des graines, certaines analyses non destructives sont possibles : détection de spectre proche infrarouge (NIRS : *Near-Infrared Spectrometry*) ou résonance magnétique nucléaire.

Analyse du phénotype des T2

Si les modifications souhaitées doivent affecter le phénotype des plantes en phase végétative, des observations sur les transformants initiaux – dits T1 – peuvent permettre l'identification des lignées potentiellement intéressantes. Si l'objectif est la modification de la composition lipidique ou protéique des graines, il sera nécessaire d'attendre la production de la descendance dite T2 et de réaliser l'analyse des graines **portant la construction génétique et**

donc fluorescentes. Un des avantages à effectuer de la biologie translationnelle sur la caméline réside dans la facilité d'accéder au contenu en huile sur des plantes individuelles, ce qui est possible mais difficile chez *A. thaliana* (figure 3a). Une micropresse, développée à l'Inra de Versailles, permet d'extraire quelques dizaines de microlitres d'huile par centrifugation à partir d'une centaine de milligrammes de graines. Une partie seulement de la descendance d'une plante, de l'ordre de 10 grammes par plante, est ainsi nécessaire, tandis que le reste peut être utilisé pour d'autres analyses.

Confirmation du phénotype des T3

L'analyse des T2 permet d'identifier un très petit nombre de lignées intéressantes, pour lesquelles il est souhaitable d'approfondir les analyses. Bien souvent, pour des études nutritionnelles notamment, il faut obtenir plusieurs kilogrammes de graines cultivées avec les témoins *ad hoc* dans des conditions contrôlées. Ce niveau de production est possible en serre, par exemple en culture sur pains de tourbe alimentés en solution nutritive. Si la modification phénotypique concerne la composition lipidique de la graine, une petite presse à vis, reposant sur le même principe que celui des presses industrielles, permet d'extraire de plus grosses quantités d'une huile de type « vierge, première pression à froid » équivalente à celle du commerce (Figure 3b).

Essai en champ

L'étape ultime du pipeline, non encore réalisée à Versailles, est l'essai au champ à petite échelle. Lorsque l'on intervient dans le métabolisme de la plante, des effets indirects des modifications peuvent en effet survenir, difficiles à déceler en serre. Or la culture au champ (figure 3c) est soumise tout naturellement à des conditions de stress biotiques et abiotiques le plus souvent absente de la culture sous serre. Évaluer le comportement agronomique des plantes modifiées apparaît donc crucial. À l'institut de recherche de Rothamsted, au Royaume-Uni, la production d'acides gras polyinsaturés oméga-3 chez la caméline a ainsi pu être analysée grâce à des essais contrôlés en champs (2).

Des applications multiples

De nombreuses applications concernent le rendement et la qualité de l'huile. Ces deux caractères sont facilement améliorables chez *A. thaliana*, mais impossible à évaluer dans des conditions agronomiques de plein champ. *Arabidopsis* n'est pas une espèce cultivée, et donc son évaluation en condition agronomique n'est pas possible, la taille de la plante et des graines ne permettant pas par exemple de réaliser des récoltes sur de grandes surfaces. La transformation du colza est réalisable mais techniquement lourde et celle du tournesol est très complexe. La possibilité d'évaluer simplement de nouveaux caractères agronomiques fait donc de la caméline un outil de recherche translationnelle efficace.

Une huile riche en oméga-3

Un des exemples les plus emblématiques de l'utilisation de cette plante dans ce domaine est la création d'une huile végétale riche en acides gras oméga-3 polyinsaturés à très longues chaînes de type acide eicosapentaénoïque (C20:5, EPA) ou acide docosahexaénoïque (C22:6, DHA). Une alimentation riche en ces acides gras est préconisée contre les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, mais aussi pour le développement fœtal. Ils sont

principalement trouvés dans les micro-algues et les poissons gras, en amont et en aval respectivement de la chaîne alimentaire. Actuellement, l'industrie aquacole est contrainte de fournir des farines animales pour l'enrichissement en DHA et EPA des poissons comme le saumon d'élevage, afin qu'il possède le niveau de lipides oméga-3 requis. Une source d'alimentation plus durable à base d'huile végétale, qui préserverait les ressources halieutiques, est donc particulièrement recherchée.

La production de DHA et EPA chez les plantes a été possible tout d'abord chez *A. thaliana*, via l'introduction de la $\Delta 6$ désaturase de la micro-algue *Otrococcus tauri*, qui permet de produire de l'acide stéaridonique (C18:4, SDA) (3,4). L'expression combinée de cinq gènes a ensuite permis de produire environ 3,6 % d'EPA chez *A. thaliana* (5). Cette stratégie a été validée chez la caméline, avec une accumulation d'EPA doublée dans la graine comparée à celle d'*A. thaliana*. La production de DHA a suivi une stratégie similaire, avec le test de nombreuses constructions génétiques chez *A. thaliana* et leur validation chez la caméline. L'expression de sept gènes permet ainsi une accumulation de 14 % de DHA et de 12 % d'EPA dans la graine de caméline, des teneurs équivalentes à celles trouvées dans les poissons gras tel le saumon (6). Ces teneurs ont été confirmées dans des essais en champ et ont permis d'alimenter avec succès des saumons d'élevage (2,7). Cet exemple illustre parfaitement l'intérêt des deux espèces, *A. thaliana* et caméline, permettant de tester facilement un grand nombre d'innovations et de valider très rapidement ces innovations dans des conditions agronomiques.

Des molécules pour l'industrie

Un autre intérêt de la caméline est la production de nouvelles molécules pour l'industrie. Les Acétyl-TGA sont des triglycérides (TGA) particuliers, dont un acide gras est remplacé par un groupement acétyle. Cette modification réduit la viscosité ainsi que le point de fusion des huiles, des caractères recherchés pour les lubrifiants, émulsifiants ou plastifiants. Ce type de TGA se retrouve dans les graines de plantes comme le fusain ailé nain (*Euonymus alatus*), qui possède une enzyme capable de transférer spécifiquement le groupement acétyle sur le diacylglycérol. L'étude du transcriptome de cette espèce a permis d'identifier des gènes candidats pour cette activité enzymatique. Laquelle a finalement été formellement identifiée grâce à l'expression des différents gènes candidats chez *A. thaliana* (8). Transféré dans la caméline, ce gène permet la production de plantes dont l'huile est composée à plus de 50% d'acétyl-TGA (9). Les essais en champ ont montré que cette très forte teneur ne modifie ni le rendement en grains ni la germination de ces derniers (9,10). L'huile ainsi produite présente une faible viscosité, une température de cristallisation plus élevée ainsi qu'un plus fort pouvoir calorifique, ce qui en fait une alternative directement utilisable pour des lubrifiants ou des fluides hydrauliques.

Après broyage des graines et extraction de l'huile, le tourteau résiduel, riche en fibres et en protéines, est un produit dérivé pouvant avoir une forte valeur ajoutée en alimentation animale notamment. Le tourteau de caméline présente un intérêt certain pour cette utilisation, car il contient des résidus de TGA riches en acides gras polyinsaturés, une composition nutritionnelle qui a un impact fort sur de nombreux produits finaux, tels que la viande et le lait, ou encore sur les œufs chez les volailles (11-14). Le taux relativement faible (13 à 36 $\mu\text{mol/g}$ de graines) de glucosinolates – composés soufrés responsables de l'amertume du tourteau – des graines de caméline est compatible avec les usages en alimentation animale. Il est néanmoins susceptible d'être réduit, via la recherche de nouvelles variétés naturelles ou modifiées (15).

Améliorer le contenu en protéines

Un autre grand front de recherche concerne le contenu en protéines de la graine, qui est un enjeu majeur de la qualité alimentaire de la graine et du tourteau. Les protéines végétales sont de plus en plus utilisées comme substitut aux protéines animales, mais la majorité est aujourd'hui importée sous forme de soja. Des efforts restent à mener pour rendre les protéines du tourteau plus digestibles par les animaux, améliorer le contenu en acides aminés soufrés et/ou changer la composition de la graine afin de produire des protéines plus facilement **valorisable dans l'industrie en particulier pour l'alimentation animale**. Les recherches se poursuivent chez *A. thaliana* et chez le pois. La caméline est également une espèce intéressante, car une bonne partie de ses réserves se font sous forme de protéines.

Des limites bientôt levées ?

L'amélioration de la caméline est essentielle pour développer commercialement cette espèce. Mais la présence de 3 génomes, on parle d'espèce hexaploïde, conduit à une forte redondance génétique et limite sérieusement l'amélioration conventionnelle de cette espèce (16). Ainsi, l'introduction de caractères comme ceux associés à la richesse en acide oléique dans l'huile, est difficile car nécessite d'identifier ces allèles pour les 3 sous-génomes dans les populations naturelles (17). Cette limitation est toutefois en passe d'être levée grâce aux nouvelles technologies d'édition de gènes de type CRISPR/Cas9. L'obtention rapide – en moins d'un an – de toutes les combinaisons génétiques à un locus donné a ainsi été démontrée récemment chez la caméline*. La combinatoire des différents allèles pour chaque gène homologue permet de créer une diversité de ressources génétiques unique. Enfin, la possibilité de ségréger la nucléase Cas9, directement dans la descendance ou par croisement, permet de fixer les mutations obtenues tout en éliminant le locus transgénique, ne laissant que la mutation créée. Cette approche modifie complètement les stratégies d'amélioration variétale, car elle permet de sélectionner des variétés en identifiant des mutations directement dans un ou plusieurs gènes cibles ou inversement en sélectionnant des caractères (qualité du grain, résistance au stress, floraison...) dans des populations de plantes mutées aléatoirement sur certains gènes. L'avenir de cette technologie dépendra néanmoins du statut juridique de ces futures plantes issues de l'édition de gènes et des régulations qui seront mises en place pour les cultiver en France, en Europe et dans le reste du monde.

* Données non publiées

- (1) Faure J-D, Tepfer M (2016) *Oilseed Fats Crops Lipids* 23, D503
- (2) Usher S *et al.* (2015) *Metab Eng Commun* 2, 93-8
- (3) Domergue F *et al.* (2005) *Biochem J* 389, 48390
- (4) Sayanova O *et al.* (2012) *Plant Biotechnology J* 10, 195-206
- (5) Ruiz-Lopez N *et al.* (2013) *Metabol Eng* 17, 30-41
- (6) Ruiz-Lopez N *et al.* (2015) *Plant Biotechnol J* 13, 1264-75
- (7) Betancor MB *et al.* (2015) *Sci Rep* 5, 8104
- (8) Durrett TP *et al.* (2010) *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 9464-9
- (9) Liu J *et al.* (2015) *Plant Biotechnol J* 13, 858-65
- (10) Liu J *et al.* (2015) *Ind Crop Prod* 65, 259-68
- (11) Ryhänen E-L *et al.* (2007) *J Sci Food Agric* 87, 1489-94
- (12) Taranu I *et al.* (2014) *PLoS ONE* 9(10), e110186
- (13) Colombini S *et al.* (2014) *J Sci Food Agric* 94, 736-743
- (14) Pikul J *et al.* (2014) *Small Ruminant Research* 122, 44-9

- (15) Schuster A, Friedt W (1998) *Ind Crop Prod* 297-302
(16) Kagale S *et al.* (2014) *Nat Commun* 5, 3706
(17) Kang J *et al.* (2011) *Plant Physiol Biochem* 49, 223-9

Légendes

Figure 1 : Comparaison des plantes (a), des graines (b), des génomes et durée d'un cycle de vie graine à graine (c) entre *Arabidopsis thaliana*, la caméline et le colza. La caméline présente des caractéristiques génétiques et développementales intermédiaires entre *A. thaliana* et le colza.

Figure 2 : Principe de la transformation génétique de la caméline

Pour toutes les espèces végétales, l'efficacité de la transformation génétique dépend du stade de développement et de l'état physiologique des plantes. Pour la caméline, l'état approprié, le début de floraison, est atteint un peu plus d'un mois après la mise en culture (a).

Le simple trempage des pointes des hampes florales dans une suspension d'*Agrobacterium* permet l'obtention de transformants – intégration de l'ADN-T de l'agrobactérie dans le génome de la plante grâce à la machinerie cellulaire de la bactérie –, mais l'efficacité est bien meilleure si les agrobactéries sont infiltrées sous vide (40 mBar pendant 5 min) entre les cellules (b). Ce procédé mis au point pour *A. thaliana*, a été optimisé plus récemment pour la caméline. Les graines transformées, qui ont reçu l'ADN de transfert (ADN-T) bactérien, sont identifiées par l'expression d'un marqueur fluorescent rouge (c).

Figure 3: Validation des caractères agronomiques à différentes échelles au cours du processus de sélection des lignées

La plante individuelle permet d'identifier l'événement de transformation apportant le caractère recherché (a). La micropresse permet d'extraire l'huile de quelques centaines de graines (à droite). Les descendants des plantes sélectionnées sont ensuite cultivés et validés en serre avec plusieurs centaines d'individus (b). Plusieurs kilogrammes de graines peuvent être pressés par une minipresse (à droite). Enfin, les lignées élites peuvent être cultivées au champ (c).

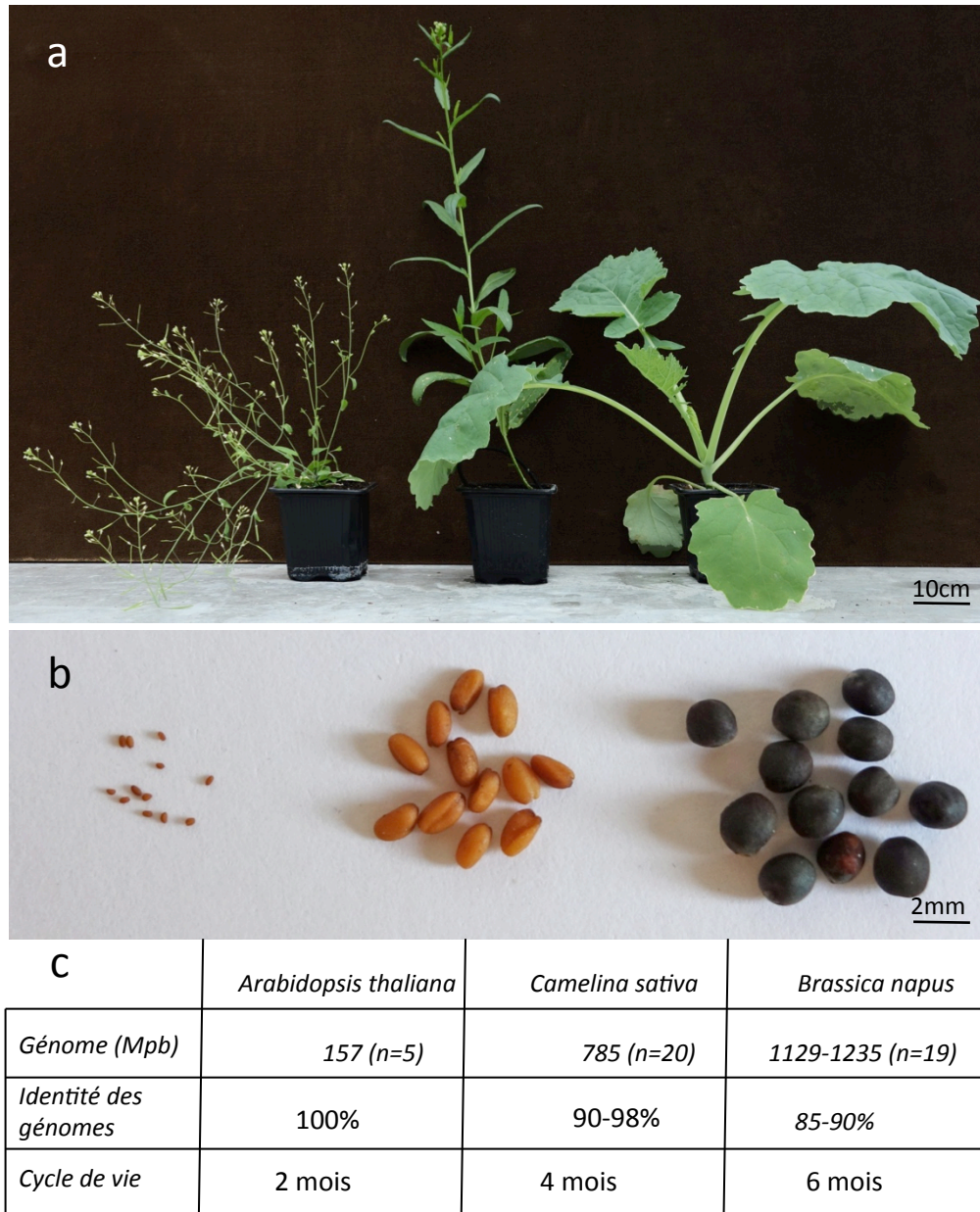


Figure 1. Cameline présente des caractéristiques génétique et développementale intermédiaires entre Arabidopsis et le colza. Comparaison des plantes (a), graines (b), génomes et durée d'un cycle de vie graine à graine (c) entre arabidopsis, cameline et colza.

Figure 1

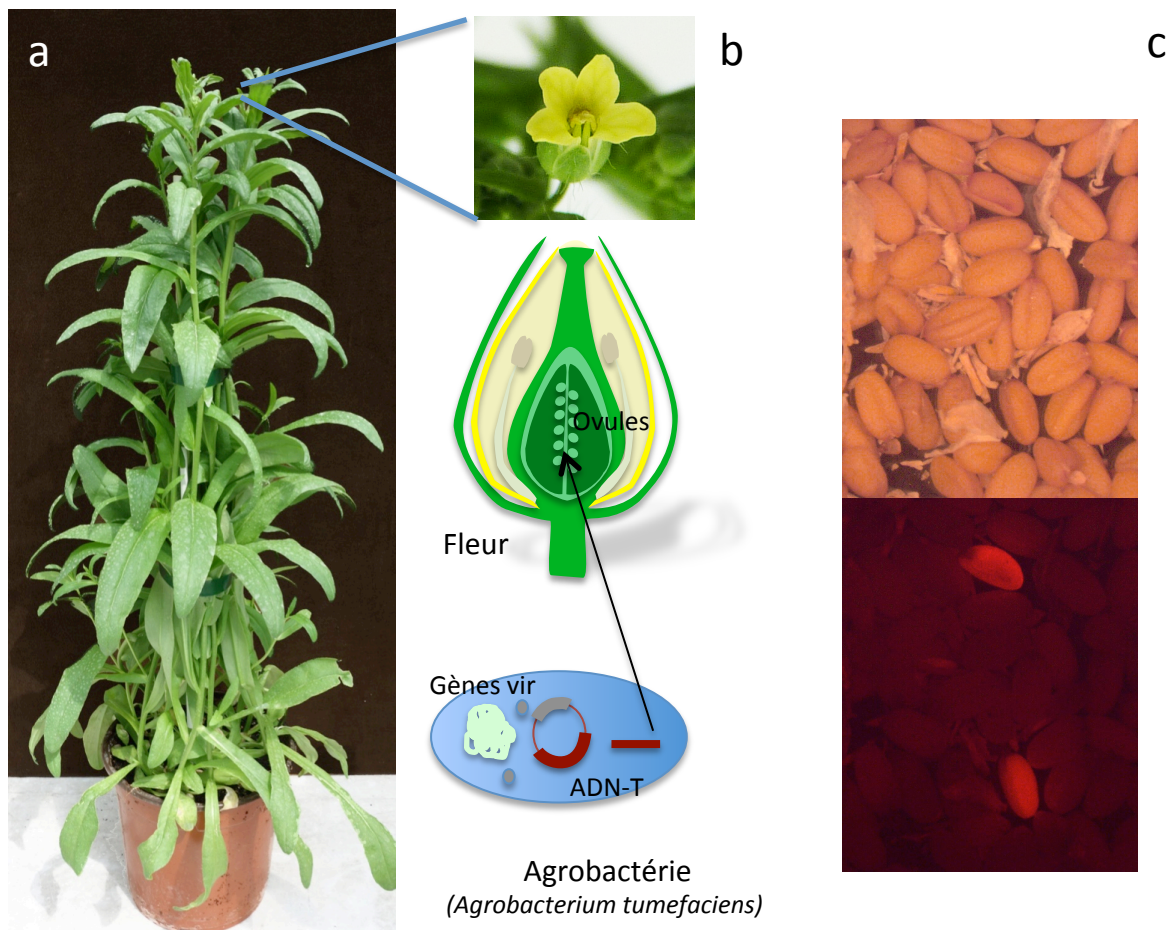


Figure 2. Le principe de la transformation génétique de la caméline. Pour toutes les espèces végétales, l'efficacité de la transformation génétique dépend du stade de développement et de l'état physiologique des plantes. Pour la caméline, l'état approprié, le début de floraison, est atteint un peu plus d'un mois après la mise en culture (a).

Le simple trempage des pointes des hampes florales dans une suspension d'*Agrobacterium* permet l'obtention de transformants (c.a.d l'intégration de l'ADN-T de l'agrobactérie dans le génome de la plante grâce à la machinerie cellulaire de la bactérie), mais l'efficacité est bien meilleure si les agrobactéries sont infiltrées sous vide (40 mb 5 min) entre les cellules (b).

Ce procédé a été mis au point d'abord sur *arabidopsis*, et plus récemment sur la caméline. Pour faciliter l'infiltration des camélines au bon stade (elles ont un bon mètre de hauteur!), un caisson de vide est utilisé, comme chez *Arabidopsis*. Les graines transformées c.a.d ayant reçu l'ADN-T sont identifiées par l'expression d'un marqueur fluorescent rouge (c). Pour chaque transformation, il est utile d'obtenir quelques dizaines d'événements de transformation initiaux indépendants (T1). Les analyses de phénotypage au niveau T2 permettront ensuite la sélection des quelques lignées les plus prometteuses. Pour la culture à plus grande échelle, à partir de la génération T3, on peut se permettre de ne garder qu'une ou deux lignées, à comparer au témoin non modifié.

Figure 2



Figure 3. Validation des caractères agronomiques à différentes échelles au cours du processus de sélection des lignées. La plante individuelle permet d'identifier l'évènement de transformation apportant le caractère recherché (a). En particulier l'utilisation d'outils comme la micropresse permettant d'extraire l'huile de quelques centaines de graines (à droite). La descendance des plantes sélectionnées sont ensuite cultivées et validées en serre avec plusieurs centaines d'individus (b). Plusieurs kilos de graines peuvent ensuite être pressés par une mini-presse (à droite). Enfin, les lignées élités peuvent finalement être cultivées au champs (c).

Figure 3