



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche
Scientifique



Université Batna 2

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département Ecologie et Environnement

Master2 Ecophysiologie végétale

Cours transgénèse végétale

Dr. KHATER Nadia.

Introduction

Les espèces évoluent continuellement et l'homme a mis à profit cette variabilité pour adapter les végétaux cultivés à ses besoins. Il sera toujours nécessaire d'améliorer les plantes pour répondre à l'évolution des contraintes biotiques (maladies, prédateurs...) ou abiotiques (salinité, sécheresse...) et assurer des rendements minimum.

De nouveaux objectifs de la transformation génétique ou la transgénèse végétale est l'introduction contrôlée d'un segment spécifique d'ADN dans le génome d'une plante receveuse en excluant la fécondation et l'hybridation. D'autres techniques asexuées sont utilisées à savoir l'hybridation somatique (fusion des protoplastes) et la cybridation (fusion cytoplasmique). Alors que la transformation génétique est le seul moyen qui à la fois l'insertion et l'intégration d'un fragment spécifique d'ADN. L'insertion du gène désiré dans un organisme hôte nécessite la localisation ainsi que l'isolement du gène responsable du caractère d'intérêt chez l'organisme donneur.

La transformation génétique chez les plantes a été possible après le développement de la culture des tissus. Le processus de transformation nécessite l'introduction du gène dans les cellules ou les tissus végétaux. La plante transgénique est régénérée à partir des cellules transformées. Le phénomène de la totipotence chez les plantes permet la réalisation du processus de régénération. Ce phénomène est défini comme l'aptitude des cellules végétales de donner des plantes entières sous certaines conditions favorables et avec la présence des éléments nutritifs et quelques régulateurs de croissance. Qualité et de durabilité s'y ajoutent.

1. Définition de la transgénèse végétale

La transgénèse est le transfert par des moyens artificiels d'un gène dans le génome d'un organisme; cette transformation touche toutes les cellules de l'organisme, y compris les cellules reproductrices. Elle est donc transmissible à la descendance de l'organisme modifié.

Les transformations induites par les techniques de transgénèse peuvent :

- Apporter une fonction nouvelle (résistance à un ravageur, tolérance à un herbicide etc.) ;
- Inactiver une fonction déjà existante (réduire ou supprimer une protéine naturellement présente dans une plante.

C'est une technique de transfert et d'intégration d'un ou plusieurs gènes à l'intérieur du patrimoine génétique d'un organisme vivant. Plusieurs découvertes scientifiques ont permis d'aboutir à l'obtention de la première plante transgénique en 1983. La compréhension des mécanismes responsables de la galle du collet, maladie connue depuis l'antiquité, a permis la mise en évidence d'un transfert génétique naturel. Elle est à l'origine des techniques de transformation génétique utilisées aujourd'hui.

2. Les différentes stratégies de transgénèse

2.1.Introduire un nouveau caractère

C'est un cas où le transfert de gènes s'accompagne d'un transfert de caractère. Une copie du gène d'intérêt est introduite dans la plante. Son expression, par l'intermédiaire d'un ARN messager, entraîne la production d'une protéine, responsable du nouveau caractère.

Les exemples dans ce domaine sont nombreux : introduction d'un gène de résistance à des insectes, à des pathogènes, à des herbicides, modification de la composition des graines, production de molécules d'intérêt industriel ou pharmaceutique.

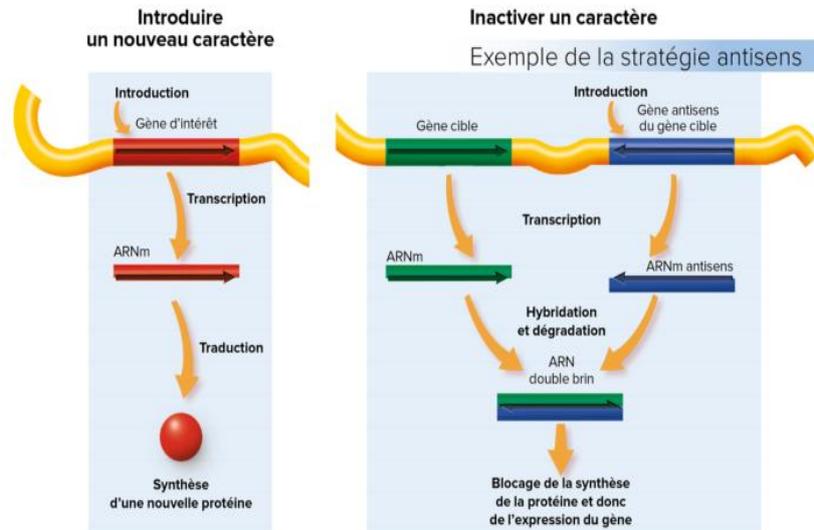
2.2.Inactiver un caractère

Dans ce cas, il n'y a plus à proprement parler de transfert de gènes, on agit sur l'expression d'un gène déjà présent dans la plante.

La stratégie antisens est la voie la plus couramment utilisée. Elle consiste à bloquer l'expression d'un gène cible. Une copie « inversée » de ce gène est introduite, d'où le nom de la technique.

Les ARN messagers (ARNm) produits par la copie originelle du gène et par celle introduite sont complémentaires. Ils s'hybrident donc et forment une molécule d'ARN double brin. Cette molécule aberrante est dégradée. Ainsi l'expression du gène est bloquée et le caractère ne s'exprime plus. Cette technique a permis d'obtenir des espèces végétales à teneur en lignine réduite, des tomates et des melons à maturation retardée, ou des pommes de terre contenant moins d'am

La transgénèse : différentes stratégies



3. Les Etapes 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 :

- a. **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.

b. 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.

Étape 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.

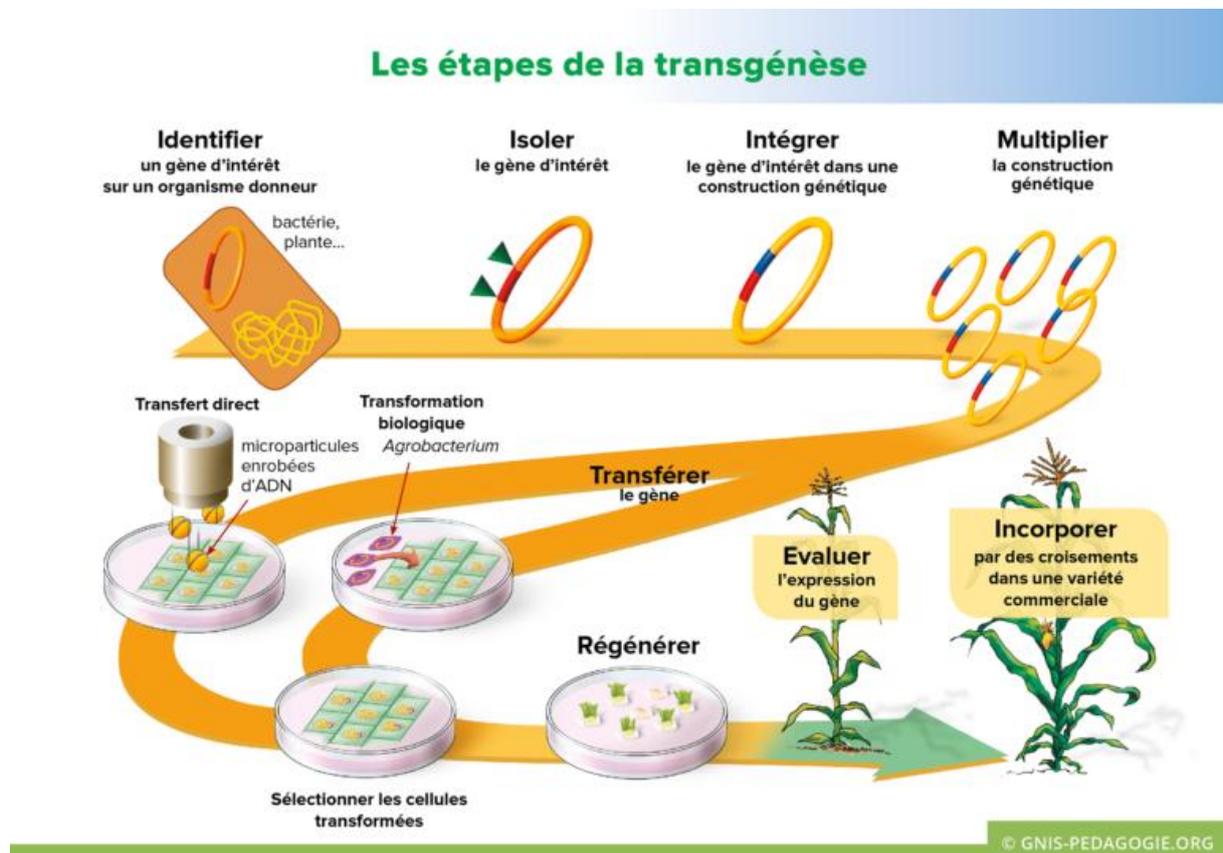
Les plantes régénérées sont ensuite analysées à différents niveaux :

- 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

Etape 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.



4. La réalisation de la construction génétique

4.1. Identifier et isoler le gène d'intérêt

La construction d'un transgène débute par le repérage d'un caractère intéressant et l'identification de la protéine responsable de ce caractère, puis du gène codant cette protéine.

Par exemple, une bactérie, *Bacillus thuringiensis*, utilisée en pulvérisation pour lutter contre certains papillons ravageurs des cultures de maïs, possède un gène permettant la production d'une protéine qui se transforme en toxine dans le tube digestif de la pyrale.

Ce gène d'intérêt a ensuite été isolé et cloné.

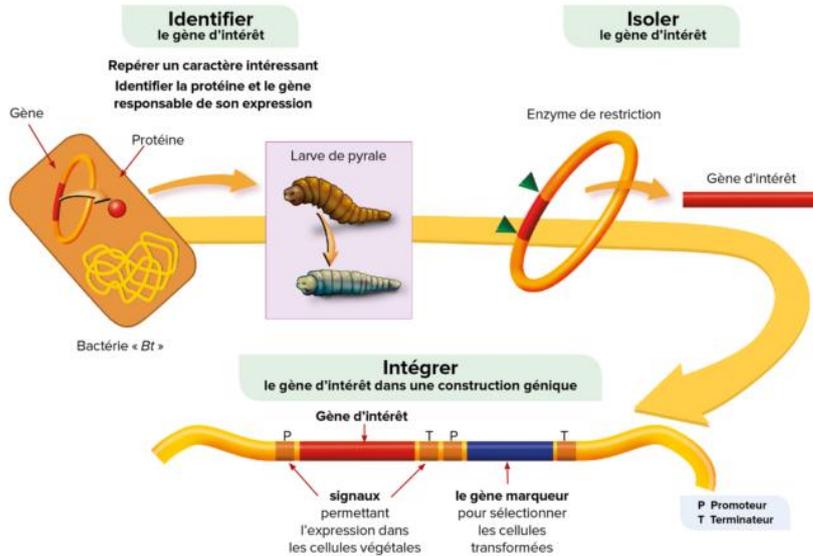
4.2. Intégrer le gène d'intérêt dans une construction génique

Un gène d'intérêt est constitué d'un promoteur, d'une séquence codante et d'un terminateur.

- **Les signaux.** Des signaux de régulation sont indispensables. Le promoteur, séquence située en amont du gène, est responsable de la transcription de l'ADN. Une séquence terminatrice est également
- **Indispensable.** Située en aval, elle signale la fin de la séquence codante. D'autres séquences peuvent être ajoutées. Elles permettent de réguler l'intensité de l'expression du gène ou de cibler le lieu d'accumulation de son produit (protéine).
- **Les gènes de sélection.** Ces gènes permettent de repérer et de sélectionner, au cours des étapes suivantes de la transformation génétique, les cellules ayant intégré le gène d'intérêt. Il peut s'agir de gènes de résistance à des antibiotiques ou à des herbicides. Les cellules transgéniques sont alors sélectionnées par l'expression de leur résistance dans un milieu contenant l'antibiotique ou l'herbicide.

Tous ces fragments de gènes d'origines différentes, promoteur, séquence codante, terminateur et gènes de sélection, sont assemblés *in vitro*. On obtient ainsi la construction génique qui est multipliée puis utilisée pour l'étape de transformation.

La réalisation de la construction génétique



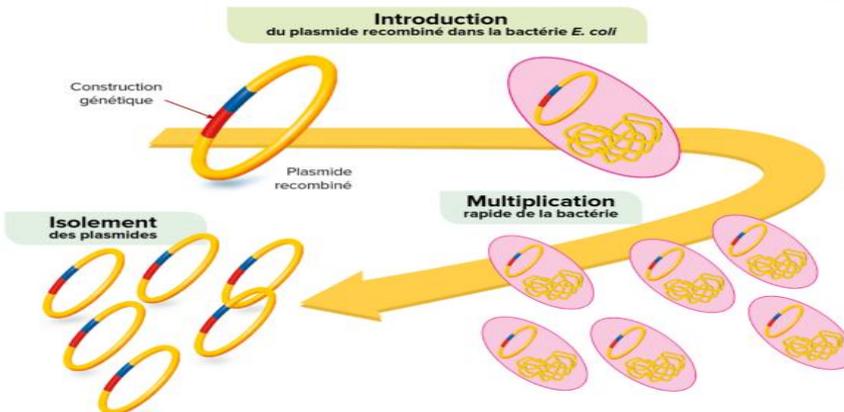
© GNIS-PEDAGOGIE.ORG

5. La multiplication de la construction génétique : le clonage

Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaires présentes chez les bactéries, en plus de leur unique chromosome. Ils sont utilisés pour héberger la construction génétique, car il est relativement facile de travailler sur cette petite molécule d'ADN circulaire, qui possède de nombreux sites de restriction. C'est alors un plasmide recombiné.

Le plasmide recombiné est ensuite réintégré dans une bactérie hôte, *Escherichia coli*. Par culture de cette bactérie, on obtient une multiplication rapide du plasmide. C'est l'étape de clonage de la construction génétique. Par cette méthode de nombreuses copies du plasmide recombinant sont ainsi obtenues.

La multiplication de la construction génétique : le clonage



© GNIS-PEDAGOGIE.ORG

6. 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.

6.1. 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.

6.2. 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.

6.3. 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.

7. 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.

7.1. 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.

7.2. 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.

7.3.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...

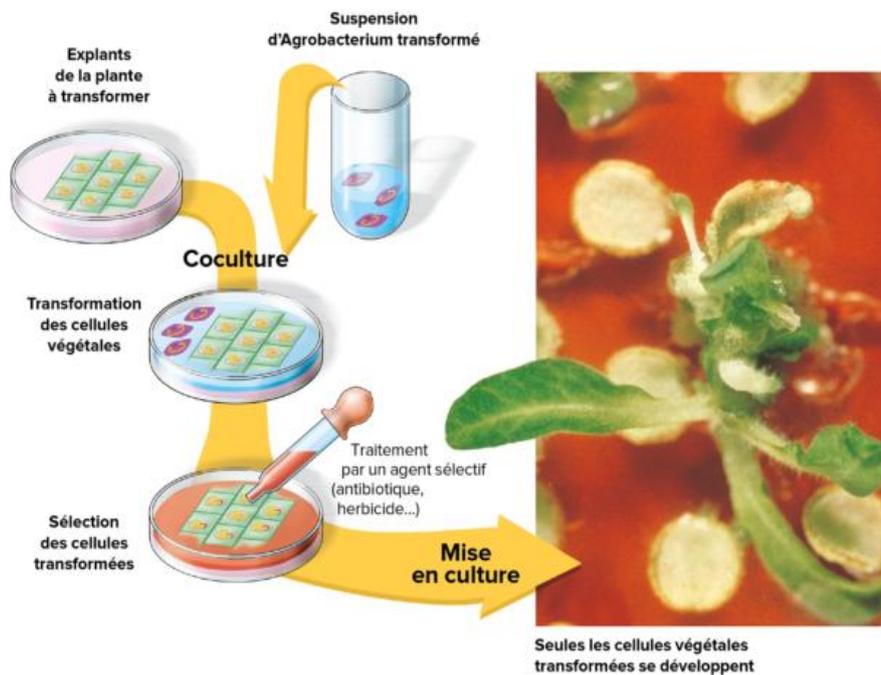
7.4.L'aptitude à la transformation

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.

7.5. 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.

La transformation biologique



© GNIS-PEDAGOGIE.ORG

8. Transformation directe

Des méthodes dites de transfert direct utilisent des moyens physiques ou chimiques pour permettre la pénétration d'ADN, généralement sous forme de plasmides dans une cellule végétale. Les plus utilisées sont la biolistique et le transfert sur protoplastes.

8.1. La biolistique

Le principe consiste à projeter sur des tissus des microparticules de tungstène ou d'or de 1 à 3 μm (1 μm = 10⁻⁶m) de diamètre enrobées d'ADN, à l'aide d'un canon à particules. La force de propulsion est obtenue soit par explosion d'une poudre dans une balle, soit par détente d'un gaz sous pression (l'hélium le plus souvent). Certaines des microparticules vont pénétrer dans les cellules, transportant avec elles l'ADN. Cet ADN doit ensuite atteindre le noyau et s'y intégrer.

C'est une méthode facile d'emploi qui a permis d'obtenir de nombreuses plantes transgéniques, notamment chez les monocotylédones, comme le maïs, le blé, le riz. C'est ainsi qu'a été obtenu le premier maïs résistant à la pyrale. En revanche, cette méthode a l'inconvénient de produire des plantes partiellement transformées, appelées chimères et parfois d'engendrer l'insertion de nombreuses copies du gène d'intérêt.

Le transfert sur protoplastes :

Deux techniques principales permettent d'introduire l'ADN dans les protoplastes :

8.2.Le transfert sur protoplastes

Les protoplastes sont un matériel privilégié pour le transfert direct de gènes. Débarrassées de leur paroi pectocellulosique, ces cellules ne présentent plus d'obstacle à l'intégration de l'ADN. Sur un mélange contenant les cellules végétales et l'ADN en solution, on modifie les conditions physico-chimiques du milieu pour provoquer une perméabilisation temporaire et réversible de la membrane plasmique.

Les molécules d'ADN pénètrent dans les protoplastes, elles doivent atteindre ensuite le noyau et s'intégrer dans un chromosome de la cellule végétale.

Deux techniques principales permettent d'introduire l'ADN dans les protoplastes :

- L'action du PolyÉthylène Glycol (PEG)

Le PEG est un polymère qui déstabilise de façon réversible les membranes plasmiques, permettant ainsi le transfert de l'ADN au travers de la membrane. Cette méthode a permis l'obtention de maïs résistant à une matière active herbicide, le glufosinate. Elle est également utilisée sur la betterave.

- L'électroporation

Cette méthode consiste à soumettre un mélange ADN-protoplastes à un choc électrique pendant une fraction de seconde. La membrane plasmique se trouve ainsi perméabilisée, ce qui permet l'intégration de l'ADN dans les cellules.

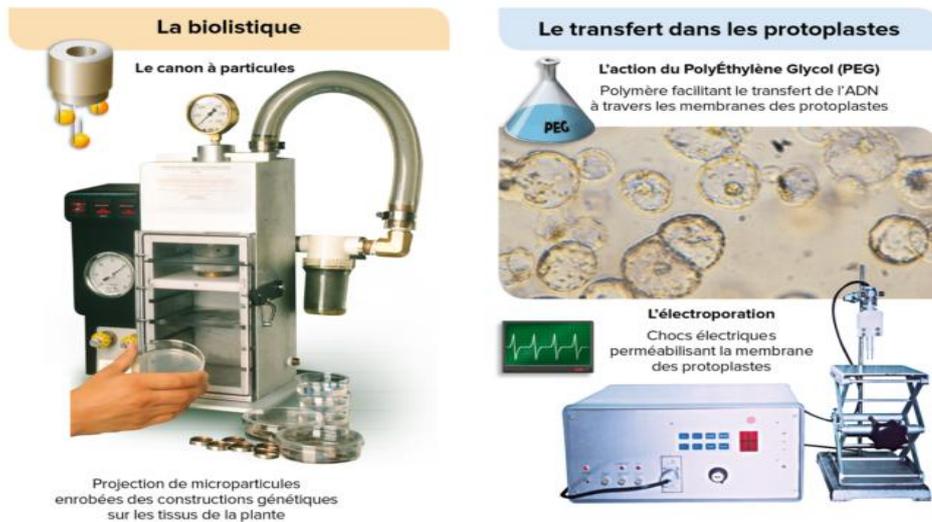
Ces deux méthodes sont relativement faciles à mettre en œuvre, mais supposent toutefois la possibilité de régénérer des plantes à partir de protoplastes, ce qui limite leur emploi chez les espèces récalcitrantes à la régénération.

Les techniques de transfert direct nécessitent également une étape de sélection des cellules transformées.

ADN "nu"

Il n'y a pas d'obligation à ce que les gènes que l'on désire introduire soient portés par des plasmides, technique la plus facile et la plus rapide. Les techniques de transfert d'ADN "nu", en cours de mise au point, permettent de réduire au maximum la longueur de l'ADN transféré.

Le transfert direct



© GNIS-PEDAGOGIE.ORG

9. L'obtention d'une variété OGM

Lors de la transformation génétique, une, deux ou plusieurs copies du gène peuvent s'insérer à différents endroits sur les chromosomes. Ainsi, chaque cellule transformée pourra donner une plante différente. Ce sont autant d'événements de transformation.

9.1. Caractérisation moléculaire et biochimique des transformants

Il faut d'abord s'assurer qu'une plante sélectionnée par sa résistance à un agent de sélection, herbicide ou antibiotique, a bien intégré le gène d'intérêt dans son génome. Ensuite, l'événement de transformation doit être caractérisé. On identifie le ou les sites d'intégration du gène et le nombre de copies intégrées dans le génome. Ces paramètres peuvent influencer le niveau d'expression du gène. Ainsi des analyses moléculaires sont conduites afin d'analyser les événements de transformation.

Enfin, il faut s'assurer que le gène introduit s'exprime et produit la protéine désirée, en quantité suffisante. Pour cela, des analyses biochimiques vont être réalisées. A cette étape, de nombreuses plantes transgéniques seront éliminées par défaut d'expression du gène d'intérêt.

9.2. La caractérisation moléculaire des transformants

Lorsque l'on transforme génétiquement une plante, il est important de déterminer rapidement si l'ADN transféré est intégré dans le patrimoine génétique de la plante. En effet, la sélection des cellules sur un milieu contenant l'agent de sélection n'est pas suffisamment fiable.

Certaines cellules, bien que non transformées, parviennent quand même à se développer sur le milieu de sélection.

9.3. Un premier diagnostic : la PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction), réaction de polymérisation en chaîne, permet sur d'infimes quantités d'ADN de détecter l'éventuelle présence du transgène.

A l'aide d'amorces spécifiques, cette technique permet de déterminer si une plante porte le gène transféré ou non, et permet également de suivre la transmission du nouveau gène dans la descendance. Les fragments amplifiés sont visualisés par migration sur un gel et leur taille est comparée à celle du fragment attendu. Ainsi sur la photographie, on observe que seules les plantes B et D possèdent un fragment pouvant correspondre au gène d'intérêt transféré.

Pour caractériser si ce gène s'exprime, on utilisera la PCR reverse (RT-PCR). Cette technique permet de vérifier la présence d'ARN messager, transcrit spécifiquement à partir du gène introduit. Une analyse plus fine : la technique de Southern

Une analyse plus fine pourra ensuite être réalisée par hybridation moléculaire ADN-ADN, selon la technique de Southern. Seule l'hybridation spécifique permet de démontrer que le gène transféré est intégré dans le génome. L'ADN total de la plante est digéré séparément par différentes enzymes de restriction. Les fragments d'ADN ainsi obtenus sont séparés par électrophorèse. Ils sont ensuite transférés par capillarité sur une membrane en nylon. Enfin, une hybridation à l'aide d'une sonde marquée (correspondant à tout ou une partie du gène transféré) permettra de déterminer le nombre de copies du transgène intégrées au génome de la plante. Ainsi dans le cas des plantes B et D, B possède une seule copie et D trois copies.

9.4. Caractérisation biochimique des transformants

Après vérification de la présence du nouveau gène dans la plante, il est nécessaire de déterminer si ce gène produit ou non la protéine désirée et en quelle quantité. Pour tester la présence et l'activité de la protéine, un test Elisa (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, Immuno-essais avec couplage enzymatique) est utilisé. Pour cela, les protéines sont obtenues à partir du broyage de tissus de plantes transformées. Ce test repose sur une liaison spécifique entre un anticorps anti-protéine cible fixé à la paroi des puits d'une plaque Elisa et la protéine produite par le gène.

Un deuxième anticorps spécifique de la protéine, couplé à une enzyme, est ajouté dans le milieu. Si la protéine est présente, il se forme un complexe anticorps-protéine-anticorps. Ensuite, on réalise un test colorimétrique : le substrat de l'enzyme est ajouté au milieu, il se lie sur les complexes fixés à la paroi et la solution change de couleur.

C'est donc une méthode visuelle de détection de la présence de la protéine.

Un lecteur de plaque Elisa permet de mesurer l'activité de la protéine, sur la base de différences d'intensité de couleur.

Sur la photographie représentant la plaque Elisa, certains puits ont changé de couleur. Dans les puits restés clairs, les plantes n'ont pas produit de protéine, elles seront donc éliminées, tandis que dans les puits dont la couleur a changé, il y a eu production de la protéine désirée. C'est une méthode simple de révélation.

Evaluation de la valeur agronomique de la plante

Des analyses portent également sur le comportement général de la plante. Il s'agit de savoir si le gène introduit confère le caractère souhaité, et de valider l'efficacité du caractère. D'autre part, l'activité du gène étranger peut interférer avec le métabolisme général de la plante. Il faut donc vérifier que le potentiel de la plante n'est pas atteint. Ainsi, des tests en serre et en champ sont menés.

Il est notamment très important de vérifier que le comportement au champ de plantes transgéniques correspond à celui attendu sur la base des observations effectuées en serre sur une ou quelques plantes. A ce stade, le niveau et la stabilité de l'expression du caractère dans différentes conditions de culture sont évalués. Seules quelques plantes seront retenues.

Enfin, il faut caractériser la transmission du caractère à la descendance.

9.6. Introgression dans une lignée commerciale élite

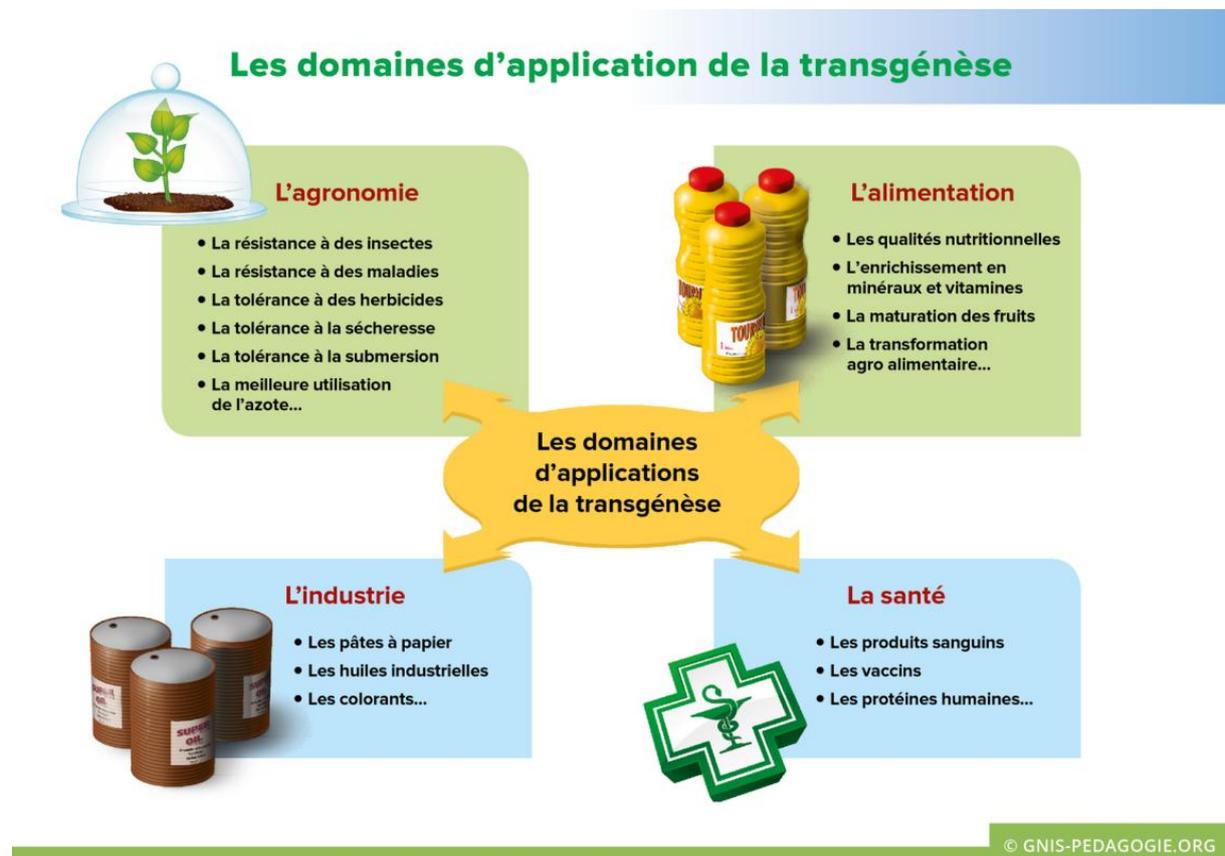
La plante ayant intégré le gène d'intérêt et satisfaisant le mieux à l'évaluation agronomique est retenue, on parle de lignée mère. Toutefois, cette plante n'est généralement pas encore la variété commerciale. En effet, l'efficacité de transformation et de régénération étant dépendante du génotype, la plante qui a été transformée est d'un génotype facilitant ces étapes. Le gène est ensuite transféré dans une lignée commerciale élite par rétrocroisements. Au cours de ces générations d'hybridation, on ne conserve que le gène d'intérêt et on élimine le reste du patrimoine génétique de la lignée mère.

Le résultat de ce processus est l'obtention d'une lignée quasiment identique à la lignée élite, mais contenant le nouveau caractère transgénique. La variété transgénique obtenue est alors proposée à l'inscription. L'obtention d'une variété OGM est le résultat de nombreuses années d'analyses et d'expérimentations.

10. Les Domaines D'application De La Transgénèse

Les exemples d'application effectifs de la transgénèse ou ceux au stade de recherche sont nombreux et peuvent être regroupés en quatre grandes catégories :

- améliorations agronomiques,
- qualités alimentaires,
- production de molécules à intérêt industriel,
- et production de molécules destinées à la santé humaine.



1. L'agriculture

Les deux applications concrètes les plus utilisées sont l'introduction de gènes de résistance pour la lutte contre les insectes nuisibles et l'insertion de gènes de tolérance aux herbicides pour la lutte contre les mauvaises herbes. Les travaux de recherche se sont multipliés pour la lutte contre les champignons et les virus, la tolérance à la sécheresse ou encore une meilleure utilisation de l'azote... La transgénèse est utilisée quand les solutions agronomiques ou la sélection classique n'apportent pas de réponses efficaces.

➤ **La résistance à des insectes**

La bactérie *Bacillus thuringiensis* constitue un véritable réservoir de gènes de résistance aux insectes. En effet, les différentes souches de cette bactérie du sol recèlent plusieurs protéines insecticides ayant différents modes d'action, et affectant uniquement certains insectes.

Chacune de ces protéines est codée par un seul gène, c'est donc un caractère facilement transférable par génie génétique. Plusieurs équipes ont obtenu des tabacs, des pommes de terre, des cotons, des tomates, des maïs résistants à des insectes grâce à cette source de gènes.

Dans le cas du maïs, la résistance à la pyrale est conférée par le gène *Cry A*, appelé communément *Bt*. Ce gène permet la production dans les cellules de maïs d'une protéine qui fonctionne comme une toxine létale dans le tube digestif de la pyrale car celui-ci contient des récepteurs spécifiques à sa surface. Chez les autres animaux et chez l'homme qui ne possèdent pas ces récepteurs, cette protéine est simplement digérée sans aucun effet toxique.

➤ **La résistance à des maladies**

Les virus, les champignons et les bactéries sont responsables de pertes importantes en production végétale. Or, il n'existe aucune méthode de traitement des maladies dues à des virus chez les plantes cultivées. Par transgénèse, il est possible d'obtenir des plantes résistantes aux virus. Ces plantes transgéniques synthétisent des protéines qui bloquent la multiplication et le développement des virus. Ainsi, il a été possible d'obtenir des courgettes et des melons résistant au virus de la mosaïque du concombre.

Autre exemple d'application de la résistance à un virus : des chercheurs de l'Institut de recherche publique brésilien (EMBRAPA) ont travaillé dix ans pour obtenir un haricot génétiquement transformé résistant au virus de la mosaïque et autorisé à la culture par la commission technique de biosécurité brésilienne en 2011.

La technique de modification sur le haricot est celle de l'interférence par ARN. Elle repose sur l'insertion de petites séquences d'acide ribonucléique (ARNsi) qui reconnaissent et détruisent l'ARN messager responsable de la production de la protéine que l'on veut éliminer. Ainsi la protéine n'est plus produite et l'effet est le même que si le gène était silencieux.

Concernant les champignons, beaucoup de variétés de pomme de terre sont sensibles au mildiou (maladie cryptogamique). Les croisements par sélection conventionnelle n'ont pas permis de créer de variétés tolérantes à cette maladie qui cause de nombreux dégâts sur le

rendement et la qualité.

Une pomme de terre de table génétiquement modifiée résistante au mildiou existe. Elle contient deux gènes de résistance issus d'espèces sauvages d'Amérique du Sud, zone d'origine de la pomme de terre. Cette pomme de terre transgénique n'est pas développée actuellement en Europe.

➤ **La tolérance à des herbicides**

Le glufosinate et le glyphosate sont deux principes actifs d'herbicides totaux qui détruisent aussi bien les mauvaises herbes que les plantes cultivées. Les gènes de tolérance à l'herbicide introduits dans une plante empêchent la matière active d'agir sur celle-ci, transformant l'herbicide total en herbicide sélectif pour cette plante. Ainsi l'herbicide détruit toutes les mauvaises herbes en laissant la plante cultivée poursuivre son développement. Ces principes actifs sont connus pour être moins rémanents. De nombreuses plantes transgéniques ont été développées pour obtenir une tolérance à ces herbicides. Il s'agit de variétés de betterave, colza, coton, maïs, pomme de terre et de soja.

➤ **La tolérance à la sécheresse**

Les contraintes environnementales comme la sécheresse, la salinité des sols et les basses températures (stress abiotiques) affectent la croissance et le rendement des plantes. De nombreuses chaînes métaboliques sont généralement affectées au cours de ces contraintes. Les sélectionneurs ont caractérisé et développé des variétés tolérantes à la sécheresse grâce à la connaissance plus précise des gènes et de leur rôle, et aux capacités d'analyse des plateformes de phénotypage.

Un maïs OGM tolérant à la sécheresse a été testé à grande échelle en 2012 sur 4000 hectares par 250 agriculteurs dans l'ouest américain.

Il contient un gène qui intervient dans le maintien de la photosynthèse en cas de stress hydrique. Ce gène, d'abord repéré dans le cas de la résistance au froid, code une protéine qui facilite la mise en place de nombreuses réactions cellulaires. Il est associé à une séquence qui n'autorise son expression qu'en cas de stress hydrique. Ce gène est actuellement testé en combinaison avec d'autres modifications génétiques, car les essais montrent qu'une croissance efficace des plantes favorise aussi la tolérance à la sécheresse.

➤ **La résistance à la submersion lors d'inondations**

Le Centre international de la pomme de terre (CIP) est situé à Lima au Pérou depuis 1971. C'est le plus important centre de recherche scientifique au monde pour les tubercules et les racines alimentaires : patate douce, pomme de terre... Il s'agit d'une association qui a pour objectif de diminuer la pauvreté, de développer la sécurité alimentaire dans les pays en développement, et à présent d'anticiper les changements climatiques.

Le CIP détient une banque génétique de plus de 5.000 variétés de pommes de terre sauvages et cultivées. En cas de catastrophes (inondations, tremblements de terre...) le CIP peut envoyer des plants des variétés détruites dans les régions dévastées pour recommencer de nouvelles cultures.

Le CIP produit également des variétés de pomme de terre génétiquement modifiées pour leur résistance aux maladies, aux pesticides et aux accidents climatiques : sécheresses, inondations...

L'utilisation de la transgénèse en recherche permet également de créer de nouvelles variétés de riz possédant un gène qui permet à la plante de résister à des inondations de plusieurs jours à 2 semaines. En effet, les moussons en Asie du Sud et du Sud-est peuvent provoquer d'importantes inondations entraînant la disparition complète des cultures de riz submergées.

➤ **Une meilleure utilisation de l'azote**

La connaissance fine des mécanismes d'absorption racinaire et de la gestion agronomique de l'azote sont deux facteurs clefs de l'utilisation de la fertilisation azotée. De nombreuses études sont conduites et les premiers résultats montrent que l'efficacité de l'absorption et du métabolisme de l'azote est régulée par plusieurs groupes de gènes. Elle est d'autant plus complexe qu'elle est étroitement liée – parfois corrélée – à d'autres mécanismes globaux comme la photosynthèse ou des réponses à des stress biotiques ou abiotiques...

Un certain nombre de gènes ont été identifiés, ils sont de bons indicateurs de l'absorption et du métabolisme de l'azote, et pourraient donc être utilisés dans des stratégies de transgénèse. Ainsi la surexpression de la glutamine synthétase chez le blé et le maïs, ou celle de l'alanine amino-transférase chez le colza ou le riz induisent : une croissance plus importante de la plante et donc de la biomasse, des augmentations du nombre et de la taille des grains, ou encore un développement de systèmes racinaires plus fins, plus denses et plus ramifiés propices à une meilleure absorption de l'azote.

Chez la plante modèle *Arabidopsis*, un facteur de transcription (protéine régulatrice de l'expression des gènes) intervenant dans les métabolismes azoté et carboné a été étudié. Sa surexpression favorise l'efficacité d'utilisation de l'azote. Ce résultat montre qu'il pourrait être intéressant de surexprimer des gènes régulateurs.

Ces projets sont en cours de développement et n'ont pas atteint le stade de la commercialisation.

2. L'alimentation

Il s'agit de modifier la composition d'une plante afin de lui apporter des avantages nutritionnels et gustatifs ou de lui conférer de nouvelles caractéristiques qui permettent de diversifier les débouchés.

➤ Les qualités nutritionnelles

En alimentation animale, les recherches vont dans le sens d'un développement de plantes permettant un meilleur bilan nutritionnel et évitant l'apport de compléments nutritifs. Ainsi, il est possible d'obtenir des plantes de maïs, colza, soja à teneurs élevées en acides aminés, notamment en méthionine et lysine, et des maïs enrichis en huile. Concernant l'alimentation humaine, des travaux sont menés pour diminuer les propriétés allergènes du riz et du soja. Pour obtenir ce résultat, on cherche à introduire dans la plante un transgène qui inhibe la synthèse de la protéine allergisante.

➤ L'enrichissement en minéraux et vitamines appliqué au manioc

Le manioc, tubercule très consommé en Afrique, fournit seulement 30% des besoins protéiques et 10 à 20% des besoins en fer, zinc et vitamine A. Les variétés de manioc contiennent également plus ou moins de cyanures (ou ses dérivés) ce qui nécessite une longue préparation des tubercules avant consommation.

Pour réduire les carences dues aux manques de protéines, de vitamines et de fer, un programme BioCassava Plus (Cassava : manioc en anglais), public-privé, est conduit par le Danforth Plant Science Institute (américain) et des organismes africains (Nigéria et Kenya). Il s'agit de développer par transgénèse des plantes de manioc qui cumulent plusieurs caractéristiques :

- Résistance aux virus,
- Diminution de la teneur en cyanure ou de ses dérivés,
- Augmentation des teneurs en protéines, en fer et en provitamine A.

Les protéines candidates pour les modifications génétiques sont la sporamine (gène de la patate douce), la protéine albumine AmA1 (gène d'*Amaranthus*) et ASP1 qui permet le stockage d'acides aminés.

Un autre exemple est celui du riz doré, enrichi en beta-carotène, précurseur de la vitamine A. l'objectif recherché est de réduire les carences en cette vitamine, lesquelles provoquent des cas graves de cécité.

➤ **La maturation des fruits**

Dans le cas du melon et de la tomate, des variétés transgéniques à maturation retardée ont été obtenues. Ces fruits peuvent être récoltés à un stade de maturation plus avancé, ils sont donc plus savoureux. D'autre part, une meilleure conservation et une aptitude au transport améliorée réduisent les pertes. Le melon est le premier fruit génétiquement modifié obtenu par un laboratoire de recherche français. La synthèse de l'éthylène, hormone responsable de la maturation des fruits, a été en partie inhibée par l'introduction d'un gène antisens. Ainsi, le détachement du fruit est retardé et le melon maintenu sur pied continue d'accumuler des sucres. Il n'a pas encore fait l'objet d'une demande de commercialisation.

➤ **La transformation agroalimentaire**

Dans ce domaine, les champs d'application potentiels sont très variés : il peut s'agir de la production de protéines impliquées dans des procédés agroalimentaires, ou de la modification de certaines propriétés des végétaux pour optimiser leur utilisation.

Ainsi, des travaux ont permis de modifier la teneur en amidon de la pomme de terre et de disposer ainsi de variétés mieux adaptées à la fabrication de fécule, de purée ou de chips. Des gènes ont également été transférés chez le colza pour modifier la teneur en acides gras ou pour obtenir des huiles contenant des acides gras recherchés en alimentation humaine.

Exemple d'amélioration des profils en acides gras appliqué au soja

Le profil lipidique de l'huile de soja ne permet pas de la conserver longtemps sans transformation industrielle. De plus, elle ne peut pas être chauffée et donc utilisée pour de la friture. Pour permettre une utilisation au four ou à la poêle, l'huile de soja ordinaire est généralement hydrogénée. Par ce procédé, on diminue la teneur en acides gras insaturés mais on induit la production d'acides gras « trans ».

Une nouvelle variété de soja génétiquement modifiée, contenant moins d'acides gras insaturés et plus stable à la chaleur, a été autorisée en 2010 par l'USDA (Département Américain de l'Agriculture). Dans ce cas, l'hydrogénation n'est pas nécessaire et cette huile présente une composition plus saine en acides gras.

3. L'industrie

Les biotechnologies ouvrent de nombreuses perspectives dans divers domaines de l'industrie. Ainsi, il est possible d'améliorer les procédés industriels et la qualité des produits, et de produire de nouvelles molécules (Molecular Farming).

➤ Les pâtes à papier

Les lignines, constituants majeurs du bois, ne peuvent pas être valorisées par l'industrie papetière. Elles doivent être éliminées par des méthodes coûteuses et très polluantes car utilisant des solvants. Des travaux conduits par la recherche publique française ont permis d'identifier les gènes impliqués dans la synthèse des lignines et de développer des variétés de peupliers transgéniques, chez lesquels le taux de lignine est fortement réduit. Le blanchissement de la pâte à papier issue de ces peupliers nécessite ainsi moins de solvants ce qui réduit l'impact sur l'environnement. Le même type de travail a été réalisé dans le cas de l'eucalyptus.

En ce qui concerne l'utilisation de l'amidon pour l'industrie des papiers, du textile et des adhésifs, les composants de l'amidon recherchés sont les amylopectines. Les variétés conventionnelles de pomme de terre contiennent 20% d'amylose qu'il faut extraire afin de ne conserver que les amylopectines. Ainsi, une pomme de terre a été génétiquement modifiée pour contenir un amidon composé presque exclusivement d'amylopectines.

➤ Les huiles industrielles

Elles sont synthétisées à partir de matières premières fossiles (pétrole), dont les ressources sont limitées. Il est donc nécessaire de s'orienter vers d'autres ressources renouvelables.

Parmi les nombreux programmes de recherche, on peut citer celui destiné à l'obtention d'un colza transgénique à haute teneur en acide gras érucique ou ricinoléique pour la production de lubrifiants, de matières plastiques, etc. Cette stratégie devrait favoriser le développement de lubrifiants et de plastiques biodégradables.

➤ **Les colorants**

Un exemple original est l'obtention de cotons transgéniques de couleur grâce à l'introduction d'un gène bactérien ou végétal codant pour un pigment. Ceci évitera l'utilisation de teintures chimiques difficilement recyclables et sources de pollution. Un œillet génétiquement modifié pour lui conférer une couleur pourpre-violette a été commercialisé en Europe jusqu'en 2005.

4. La Santé

Génétiquement modifiées, des plantes de tabac, de maïs, ou de pomme de terre peuvent produire des molécules à usage thérapeutique ou des vaccins. Le grand avantage de la production de ces molécules est l'absence de risques de contamination par des virus et prions pathogènes pour l'homme.

➤ **Les produits sanguins**

Des recherches menées en France ont permis de produire des protéines plasmatiques à partir de tabacs transgéniques, permettant l'obtention d'hémoglobine humaine recombinée. Des travaux montrent qu'il est possible de synthétiser de l'albumine humaine, employée lors du traitement des traumatismes, à partir de tabac ou de pomme de terre. Cette albumine devrait être moins chère que celle issue du plasma sanguin.

Les vaccins. Des recherches portent sur la production et la diffusion de vaccins via des fruits ou céréales. Des chercheurs ont mis au point des vaccins pour l'homme contre l'hépatite B et la gastro-entérite provoquée par la bactérie E. coli. Ces vaccins sont produits par des bananiers transgéniques et s'accumulent dans les bananes qui deviennent des aliments.

➤ **Les protéines humaines**

Des travaux sont actuellement en cours pour la production de protéines ou de glycoprotéines à usage thérapeutique à partir de diverses plantes transgéniques : soja, tabac, pomme de terre,

riz ou colza. Des travaux très avancés ont été conduits en France sur la production de lipase gastrique par des maïs transgéniques. La lipase gastrique est une protéine utilisée dans le traitement de l'insuffisance pancréatique exocrine (impossibilité pour le pancréas de faire passer dans le système digestif les enzymes nécessaires à l'assimilation des aliments).

L'absence de lipase gastrique empêche le système digestif de métaboliser les lipides contenus dans la nourriture. Ce problème affecte principalement les patients atteints de mucoviscidose ou de pathologies du pancréas.

Le gène humain codant pour cette lipase a été transféré avec succès à des maïs adaptés à la production de molécules à rôle pharmaceutique.