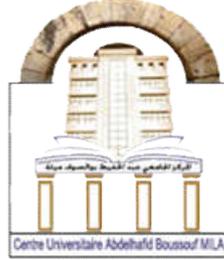


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf de Mila
Institut des Sciences et de la Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Cours de
Transgénèse végétale



Préparé et présenté par
Dr. Hakima BELATTAR

2023-2024

Préface

Ce polycopié est le support de cours de la matière transgénèse végétale de cours, conforme au programme enseigné et agréé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique , destiné aux étudiants biologistes (de 2^{ème} année Master en biotechnologie végétale), ainsi qu'aux étudiants de 3^{ème} année licence LMD Biotechnologie végétale et amélioration des plantes, qui veulent retrouver des connaissances de base dans le domaine de la biotechnologie végétale. C'est un travail personnel qui émane de ma propre expérience lors de mes activités pédagogiques dans le contenu de ce module. Afin que les étudiants comprennent et suivent le programme du deuxième master, il est indispensable de présenter les Organismes Génétiquement Modifiés (OGM), domaine des biotechnologies qui constituera le cœur de notre cours. On basant sur la présentation de la biotechnologie, son évolution historique, les domaines qui lui sont adjacents, ces applications, notamment en agriculture et dans l'industrie agroalimentaire et enfin ses diverses implications.

Dr. Hakima BELATTAR

<http://elearning.centre-univ-mila.dz/>

SOMMAIRE

Chapitre I : Introduction à la transgénèse végétale	4
1. Découverte de la structure de l'ADN	4
2. Transgénèse naturelle par conjugaison interspécifique « <i>Agrobacterium</i> »	6
3. Nouvelles propriétés physiologiques acquises par les cellules tumorales	7
3.1. Indépendance hormonale	7
3.2. Production de tumeurs	7
3.3. Nouvelle capacité métabolique	7
3.4. ADN-T	8
3.5. Gènes de biosynthèse d'hormones	9
4. Principaux pays producteurs d'OGM	11
4.1. Situation en Union européenne (UE)	12
4.2. Prévisions mondiales pour l'utilisation des cultures GM	12
Chapitre II : Les différentes stratégies de transgénèse	14
1. Introduire un nouveau caractère	14
2. Inactiver un caractère	14
3. Etapes de la transgénèse	15
4. Réalisation de la construction génétique	17
4.1. Identifier et isoler le gène d'intérêt	17
4.2. Intégrer le gène d'intérêt dans une construction génétique	17
5. Multiplication de la construction génétique : le clonage	18
Chapitre III : Technique de construction des plantes transgéniques (exemple le tabac)	20
Introduction	20
1. L'obtention de tabac transgénique	23
2. Production de protéines recombinantes dans le tabac	25
3. Exemples de trois protéines recombinantes produites dans les plantes transgéniques de tabac	26
a- Production d'allergènes dans le tabac	26
b- Production de collagène humain dans les feuilles de tabac	27
c- Importance du ciblage des protéines au sein de la cellule végétale (cas de la lipase gastrique)	27

Chapitre VI. <i>Agrobacterium</i> et le transfert de gènes chez les végétaux.....	28
1. Transfert dans les cellules végétales d'informations, de facteur(s) inducteur(s) de tumeur.....	28
2. Structure du génome d' <i>A. tumefaciens</i> C58	30
3. Processus d'infection d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
3.1. Reconnaissance bactérie / hôte.....	31
3.2. Transfert T-DNA.....	33
3.2.1. Production du brin T.....	33
3.2.2. Translocation du brin T dans la cellule végétale	33
3.2.3. Intégration dans le génome de l'hôte.....	33
Chapitre V. Vecteurs de transformation.....	36
1. Utilisation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> comme vecteur des transgènes.....	36
2. Système de transfert par co-intégration (plasmide navette)	37
3. Système de transfert binaire par conjugaison triparentale (plasmide binaire).....	38
Chapitre IV: Méthodes directes de transfert de gènes chez les plantes.....	41
1. Biolistique	41
2. Transfert sur protoplastes	40
Chapitre IIV : Applications agronomiques et industrielles	42
1. Agriculture	42
1.1. Sélection et la multiplication des plantes	42
1.2. Création de nouvelles variétés de plantes.....	42
2. Industrie agroalimentaire.....	44
Chapitre IIIIV : Plante transgéniques et leurs impacts sur la santé et l'environnement	46
1. Les OGM et leurs bénéfices	46
1.1. Santé	46
1.2. Environnement	47
2. Risques potentiels liés aux OGM	48
2.1. Santé	48
2.2. L'environnement.....	49
3. Avantages et inconvénients des OGM	49
4. Les deux types d'OGM les plus fréquents	50

4.1. OGM tolérant à un herbicide.....	50
4.2. OGM produisant un herbicide.....	51

<http://elearning.centre-univ-mila.dz/>

Chapitre I : Introduction à la transgénèse végétale

L'amélioration génétique des végétaux cultivés est pratiquée depuis très longtemps. Des fermiers sélectionnaient les meilleurs plants en conservant minutieusement leurs semences pour la saison suivante. La pratique de la sélection s'est transmise jusqu'en Amérique. Par la suite, s'est ajoutée une nouvelle méthode d'amélioration génétique : le croisement entre espèces proches parentes.

Les techniques de croisement se sont imposées dans le domaine agricole au XIXe siècle. La plupart des végétaux que nous consommons aujourd'hui sont des hybrides résultant de nombreuses années de croisements et de la sélection des meilleurs descendants. Le croisement est considéré comme une méthode d'amélioration génétique puisque le matériel génétique des plantes résultantes est différent de celui des plantes mères. Il est si différent qu'avec le temps ces plantes peuvent devenir des espèces distinctes. Le maïs, dont le rendement est cent fois plus élevé que son ancêtre le téosinte, est une espèce domestique issue d'un croisement. Cet échange de gènes par croisement n'est possible qu'entre espèces proches parentes. Ce n'est que beaucoup plus tard que l'amélioration génétique entre des espèces éloignées, par transgénèse, pourra être réalisée.

1. Découverte de la structure de l'ADN

La molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) est au centre de la transgénèse. Incluse dans chaque cellule de la majorité des êtres vivants, elle contient les éléments d'information nécessaires à l'accomplissement de diverses fonctions des cellules de l'organisme. Cette longue molécule est divisée en milliers d'unités nommées « gènes ». Ce sont les gènes qui sont transférés d'une espèce à l'autre lors d'une modification génétique par transgénèse. L'organisme obtenu est appelé un « organisme génétiquement modifié » ou OGM.

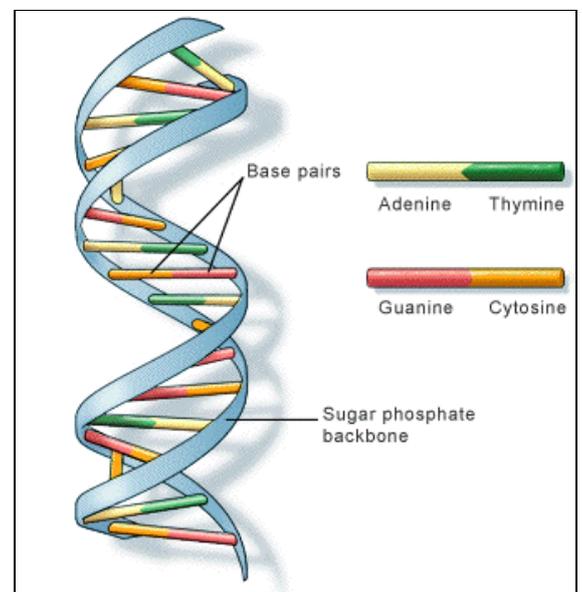


Figure 1 : Composition de l'AND
(US National Library of Medicine)

Chaque gène constitue une « instruction » pour fabriquer une protéine. Ainsi, lorsqu'un être vivant est modifié par transgénèse, la modification entraîne toujours l'ajout d'au moins une protéine dans son métabolisme ou le blocage de sa synthèse.

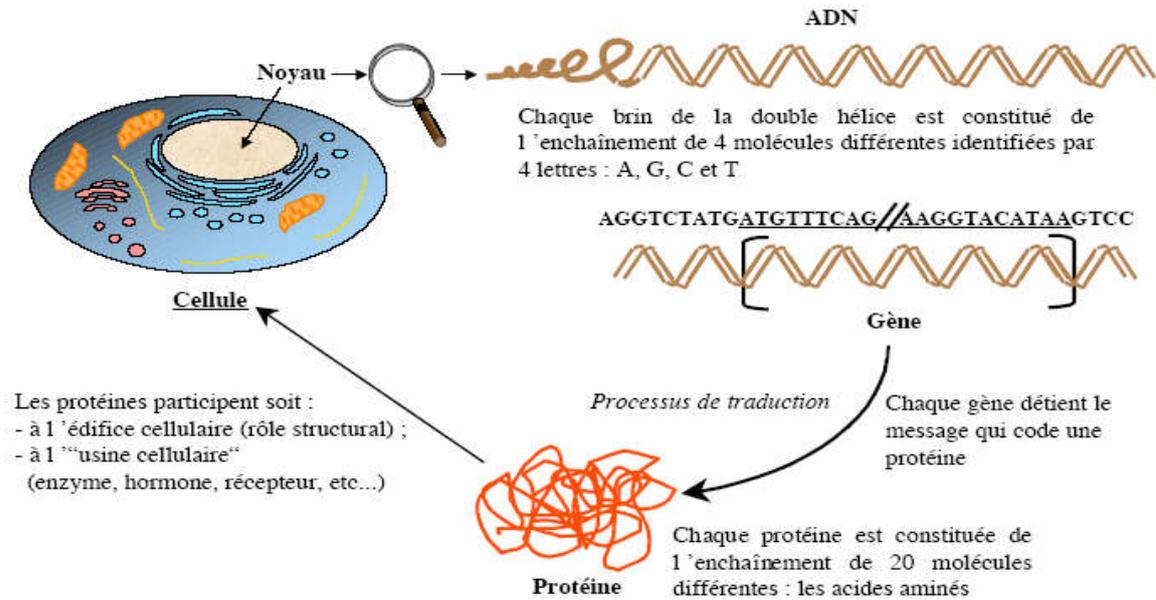


Figure 2 : Les protéines, la finalité des modifications génétiques

Les gènes utilisés jusqu'à présent en transgénèse végétale permettent de rendre les plantes tolérantes à des herbicides ou à des insectes, d'améliorer la qualité des produits, etc. les principales cultures concernées sont le soja, le maïs, le cotonnier et le colza. La production de protéines recombinantes à visée thérapeutique (sérum thérapeutique, sérum albumine humaine, hémoglobine, lactoferrine, anticorps, vaccins, etc.) par les plantes transgéniques (molecular farming) est une autre application en cours de développement. La production de protéines d'origine animale peut s'avérer plus efficace dans les cellules végétales que dans les cellules bactériennes (meilleur respect de la conformation et du repliement des protéines, meilleure maturation). En recherche fondamentale, la transgénèse permet de générer du matériel végétal qui peut ensuite être utilisé pour étudier la régulation et les fonctions des gènes, le développement ou la physiologie de la plante.

Le transfert de gènes chez les végétaux peut être réalisé soit en exploitant les propriétés naturelles et les compétences de bactéries du genre *Agrobacterium*, soit par voie « directe » en utilisant des techniques physiques ou chimiques et les propriétés de totipotence et de régénération des végétaux. La totipotence permet, à partir de cellules somatiques transformées, de régénérer une plante entière ayant acquis de façon stable de nouvelles propriétés liées à la présence du transgène. Chez les animaux, seuls les gamètes, le zygote ou les cellules souches embryonnaires peuvent être utilisés pour obtenir un organisme entier et la totipotence est beaucoup plus limitée. Ainsi le transfert de gènes chez les animaux est délicat à mettre en œuvre, comparé au transfert de gènes chez les végétaux.

2. Transgénése naturelle par conjugaison interspécifique « *Agrobacterium* »

Les bactéries du genre *Agrobacterium* sont des bactéries aérobies à Gram négatif de la microflore du sol, appartenant au groupe des *rhizobiaceae*. Ce groupe comporte en outre les genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *phyllobacterium*, bactéries symbiotiques fixatrices d'azote. Le genre *Agrobacterium* comprend plusieurs espèces : *A.radiobacter* est non-phytopathogène, tandis que *A. tumefaciens*, *A.vitis*, *A.rubi* ainsi qu'*A.rhizogenes* sont des bactéries phytopathogènes pouvant infecter de nombreuses plantes dicotylédones et quelques monocotylédones. Leurs spectres d'hôtes sont variables selon les souches. Bien que l'infection ne porte pas atteinte au développement de la plante, elle entraîne des baisses de rendement ou de vigueur et peut occasionner des dégâts importants, notamment chez les plantes pérennes telles que la vigne, le pommier ou le cerisier.

A.tumefaciens est responsable d'une prolifération cellulaire anarchique au niveau d'une blessure, entraînant la formation d'une excroissance tumorale encore appelée galle du collet ou crown gall (le collet étant la jonction entre la tige et la racine). Cette bactérie peut également entraîner la formation de galles sur les tiges ou les racines. *A.vitis* induit, chez la vigne, le développement de galles au collet et sur les tiges, ainsi que des nécroses sur les racines. *A.rubi* entraîne la formation de galles rondes sur les parties aériennes ou cane gall, alors que *A. rhizogenes* est responsable de la formation d'un chevelu racinaire ou hairy root, sorte de rhizogénése adventive au site d'infection (Figure 3).



Figure 3 : *Agrobacterium tumefaciens* et deux exemples de tumeurs (Samouelian , 2009)

(A) *Agrobacterium tumefaciens*, en microscopie électronique. Les flagelles qui permettent son déplacement dans le sol sont bien visibles. (B) collet de merisier sauvage (à gauche) et collet infecté par *A. tumefaciens* formant une tumeur naturelle (à droite). (C) formation d'une tumeur sur tige de tabac suite à l'inoculation d'une souche d'*A. tumefaciens* (tumeur expérimentale).

Les réactions des plantes à l'infection par certaines espèces *d'Agrobacterium* sont comparées à des cancers végétaux. Les cellules de ces tumeurs végétales ont acquis de nouvelles propriétés résultant d'un mécanisme de génie génétique naturel : elles ont été transformées par l'agrobactérie qui transfère une molécule d'ADN (ADN transféré ou ADN – T) dans la cellule hôte ; cet ADN-T s'intègre dans le génome de la cellule végétale et s'y exprime.

3. Nouvelles propriétés physiologiques acquises par les cellules tumorales

3.1. Indépendance hormonale

Des fragments de tumeurs ou de racines, transférés sur des milieux de culture *in vitro*, maintiennent leur capacité à proliférer en absence d'apport exogène de phytohormones (auxines et cytokinines), contrairement à des cellules végétales provenant de tissus sains. Ces cultures de racines ou de tissus de la galle du collet, repiquées régulièrement sur milieu de culture, peuvent être maintenues indéfiniment. Les divisions cellulaires actives se déroulent alors qu'aucune bactérie n'est présente dans les tissus tumoraux prélevés. Le taux d'hormones a été quantifié dans les tumeurs et trouvé significativement plus élevé que dans les tissus sains.

3.2. Production de tumeurs

Des tissus tumoraux, cultivés *in vitro*, peuvent après transplantation sur une plante saine conduire au développement d'une nouvelle tumeur. La tumeur n'est pas une réaction de la plante à l'infection par *A. tumefaciens*, mais la conséquence de la prolifération *in vivo* des cellules greffées.

3.3. Nouvelle capacité métabolique

Les cellules tumorales synthétisent de nouveaux métabolites azotés de petit poids moléculaire, les opines. La nature des opines synthétisées dépend de la souche *d'Agrobacterium*. Il existe plus d'une vingtaine d'opines résultant, selon les souches, de la condensation d'acides aminés, d'acides cétoniques et de sucres. Les plus étudiées sont l'octopine, dont les précurseurs sont l'arginine et l'acide pyruvique, et la nopaline qui a pour précurseurs l'arginine et l'acide céto-glutarique. Les opines produites par la plante sont utilisées comme sources d'azote et de carbone par les agrobactéries, permettant leur croissance et leur dissémination. L'agent pathogène crée, dans les cellules de l'hôte qu'il infecte, un environnement favorable à son développement, une niche écologique particulière qui lui confère des avantages sélectifs du fait de la biosynthèse de ces opines.

Généralement, seules les souches *d'Agrobacterium* permettant la synthèse d'une opine donnée possèdent les enzymes nécessaires à son catabolisme (Figure 4). Ainsi une souche induisant la production d'octopine peut dégrader ce composé, mais pas la nopaline. L'observation de cette corrélation stricte entre capacité de dégradation des opines et induction de la biosynthèse des opines par la plante suite à l'agroinfection avait suggéré l'existence d'un transfert génétique dès les années 1970, bien avant la mise en évidence expérimentale. Quelques bactéries du sol sont également capables d'utiliser les opines. *A. radiobacter* peut utiliser la nopaline et s'implanter dans la niche, voire même éliminer certaines souches *d'A. tumefaciens* grâce à la production par cette espèce d'une bactériocine, l'agrocine.

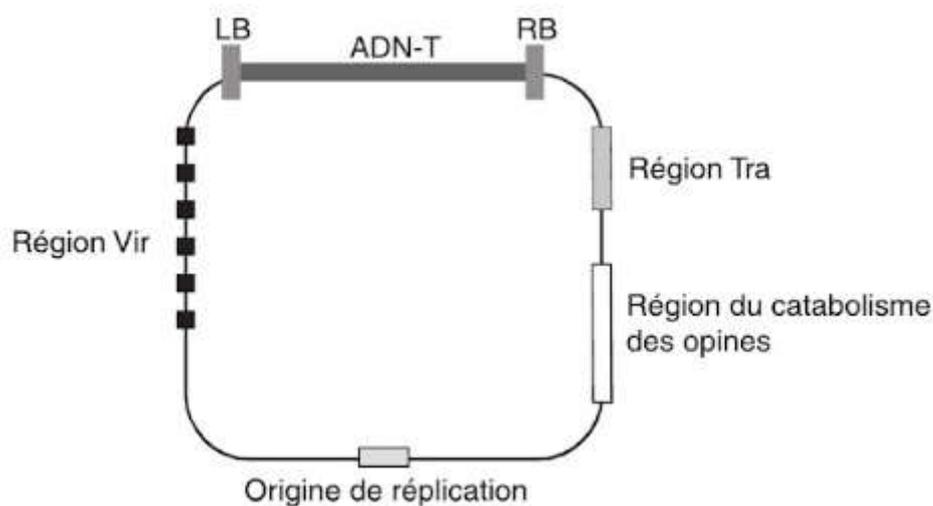


Figure 4 : Organisation des différentes régions du plasmide Ti (Samouelian , 2009)

Le plasmide Ti (environ 250 kb) comprend quatre grandes régions: la région **T** ou **ADN-T** (qui correspond à l'ADN transféré à la plante) définie par les bordures droite (RB, *Right Border*) et gauche (LB, *Left Border*); la région de virulence Vir nécessaire au transfert de l'ADN-T; la région qui code les enzymes du catabolisme des opines; la région Tra impliquée dans le transfert du plasmide Ti entre agrobactéries.

3.4. ADN-T

L'ADN-T est délimité par la présence à ses extrémités de deux courtes séquences répétées et directes de 25 pb, appelées bordure gauche (LB, *Left border*) et bordure droite (RB, *Right border*). Selon le type de plasmide Ti, une ou deux régions d'ADN-T sont présentes (1 pour les plasmides à nopaline, 2 pour les plasmides à octopine) (Figure 5). La taille de l'ADN-T varie entre 7 et 25 kpb en fonction de la nature de la région (unidue ou en deux parties) et des souches *d'Agrobacterium*.

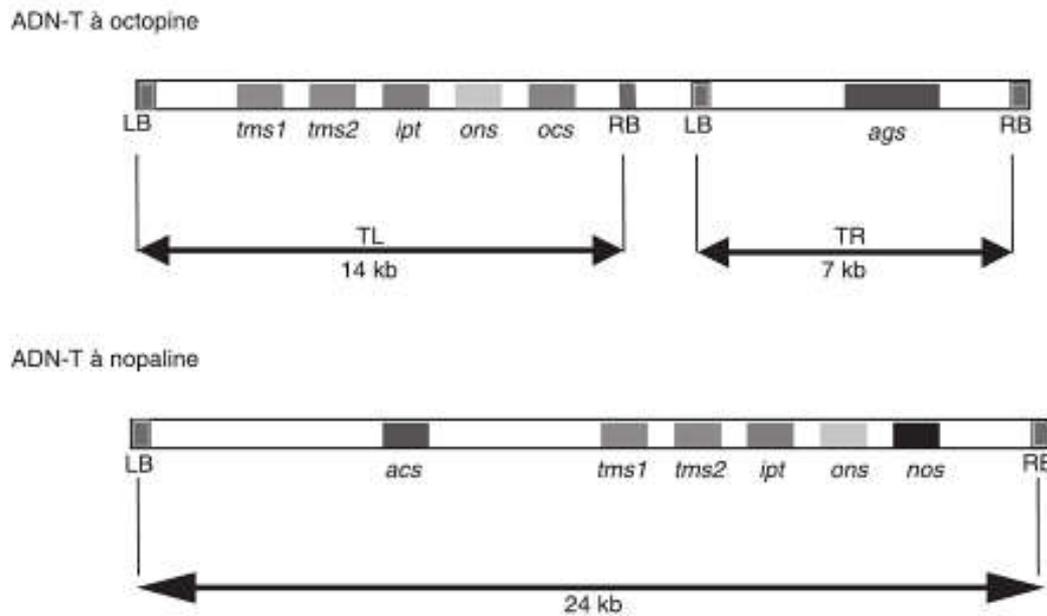


Figure 5 : Structures des régions d'ADN-T de plasmides **Ti** à octopine ou nopaline
(Samouelian , 2009)

L'ADN-T porte deux grands groupes de gènes, les oncogènes impliqués dans la formation des tumeurs (*tms1* [tryptophane 2-monooxygénase], *tms2* [indole-3-acétamide hydrolase], *ipt* [\sim 2-isopentenyl pyrophosphotransférase], voir la Figure 5.4) et les gènes de biosynthèse des opines (*ocs* [octopine synthase], *ags* [agropine synthase], *acs* [agrocinopine synthase], *nos* [nopaline synthase]). TL: *Left T-DNA*; TR: *Right T-DNA* ; *ons* : *opine secretion*.

Quant l'ADN-T est constitué de deux régions transférées, leur transfert peut être indépendant ou couplé. Les ADN-T des plasmides à nopaline et des plasmides à octopine présentent environ 40% d'homologies entre les séquences nucléotidiques ; ils sont ainsi assez bien conservés.

L'ADN-T porte deux principaux groupes de gènes : les gènes responsables de la tumorigénèse et les gènes de biosynthèse des opines. Ces gènes se distinguent des autres gènes bactériens localisés en dehors de la région d'ADN-T. Ils possèdent en effet des caractéristiques propres aux gènes eucaryotes : ils sont monocistroniques, transcrits par l'ARN polymérase II eucaryote et ils possèdent les signaux de régulation (promoteur, terminateur, site de polyadénylation) caractéristiques des gènes eucaryotes.

3.5. Gènes de biosynthèse d'hormones

Ces gènes participent à la transformation tumorale des cellules végétales. Ils codent des enzymes de la voie de biosynthèse des phytohormones. Ainsi le gène *ipt* (*tmr*), codant une Δ 2-isopentenyl pyrophosphotransférase, permet la synthèse de la cytokinine isopentényl

adénosine monophosphate. Les gènes *tms1/iaaM* et *tms2/iaaH* codent respectivement la tryptophane 2-monooxygénase et l'indole-3- acétamide hydrolase, et permettent la synthèse d'une auxine, l'acide indole acétique (AIA). La présence de ces gènes sur l'ADN-T et leur expression ultérieure dans les cellules de la plante expliquent les taux d'hormones très élevés, mesurés dans les tumeurs. L'expression de ces gènes modifie ainsi l'équilibre hormonal des tissus infectés et active la croissance cellulaire et/ ou une organogenèse anormale (Figure 6). Il en résulte des modifications de l'expression d'un ensemble de gènes de la plante, aboutissant (en fonction du nouvel équilibre hormonal généré) à des proliférations Tumorales non organisées ou au développement de tératomes avec formation de bourgeons ou de racines.

Chez les végétaux, l'équilibre hormonal a un effet sur la croissance et l'organogenèse. Un rapport cytokinines/auxines faible favorise la rhizogenèse ; un rapport élevé conduit plutôt à la formation de bourgeons, tandis qu'un rapport moyen conduit à la formation d'un tissu ou d'un cal non organisé.

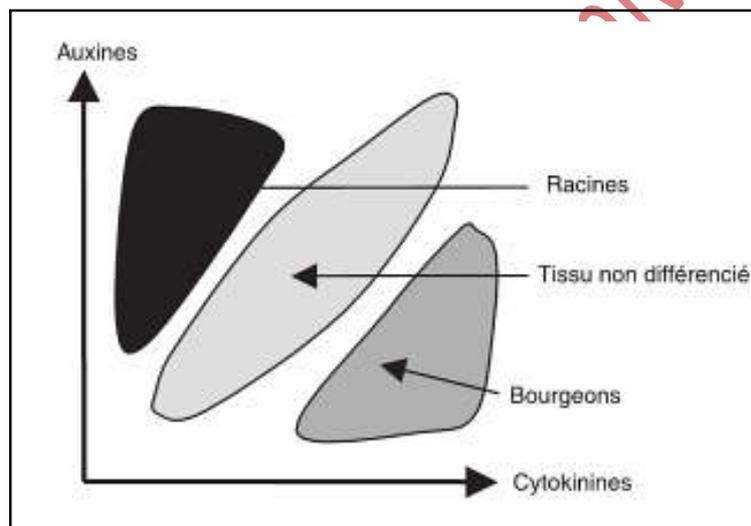


Figure 6 : Influence de l'équilibre hormonal sur la croissance et l'organogenèse (Samouelian , 2009).

Ces gènes ont été mis en évidence par mutagenèse. Les tumeurs induites par des souches présentant des mutations dans la région *tms* (*tumor morphology shooty*) forment essentiellement des bourgeons alors que des souches portant des mutations dans la région *tmr* (*tumeur morphology rooty*) induisent une rhizogenèse au site d'infection. Il a été montré que la région *tms* porte les gènes *tms1* et *tms2* (gènes de biosynthèse de l'auxine). Tandis que la région *tmr* porte le gène *ipt* (gènes de biosynthèse de cytokinines).

4. Principaux pays producteurs d'OGM

Depuis les débuts de la commercialisation des OGM en 1996, les superficies allouées à ces cultures par les principaux pays producteurs ont évolué (Figure 7).

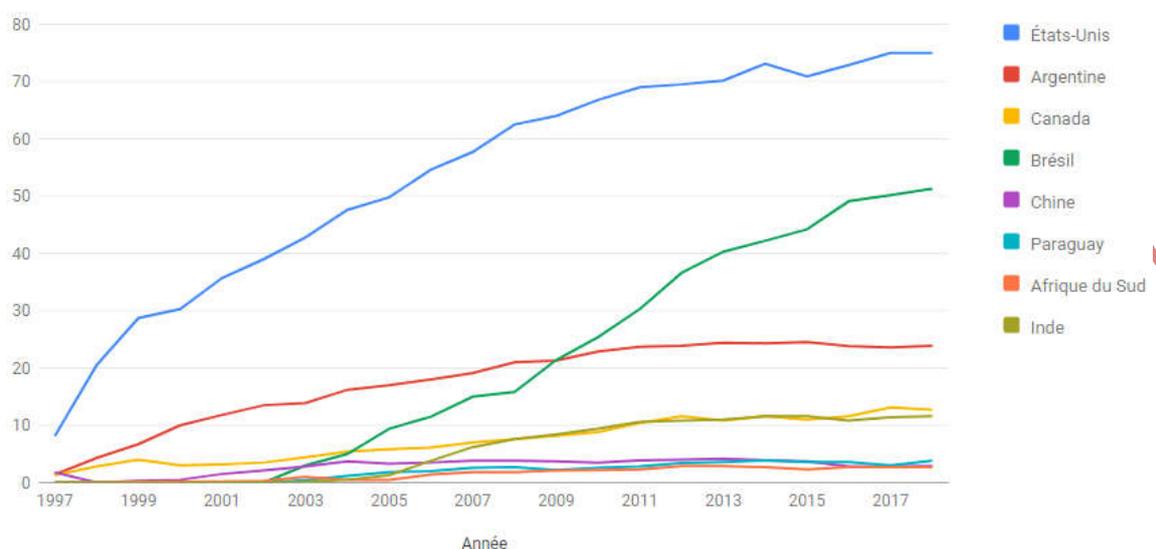


Figure 7: Principaux pays producteurs des OGM entre 1997-2018

En 2019, le nombre de pays où se cultivent des cultures GM était de 29 (24 pays en voie de développement et 5 pays industrialisés). En 2019, 90,7 % de la superficie mondiale cultivée en OGM (190,4 millions d'hectares) se retrouvait dans 5 pays :

- les États-Unis, 37,6 % de la superficie;
- le Brésil, 27,7 % de la superficie;
- l'Argentine, 12,6% de la superficie;
- le Canada, 6,6 % de la superficie;
- l'Inde, 6,3% de la superficie.

Les autres hectares de plantes GM ont été cultivés par les 24 pays suivants (en ordre décroissant de superficie) : Paraguay, Chine, Afrique du Sud, Pakistan, Bolivie, Uruguay, Philippines, Australie, Myanmar, Soudan, Mexique, Espagne, Colombie, Vietnam, Honduras, Chili, Malawi, Portugal, Indonésie, Bangladesh, Nigéria, Eswatini, Ethiopie, Costa Rica (Figure 8).

À travers le monde, près de 17 millions de producteurs auraient utilisé des espèces GM en 2019.

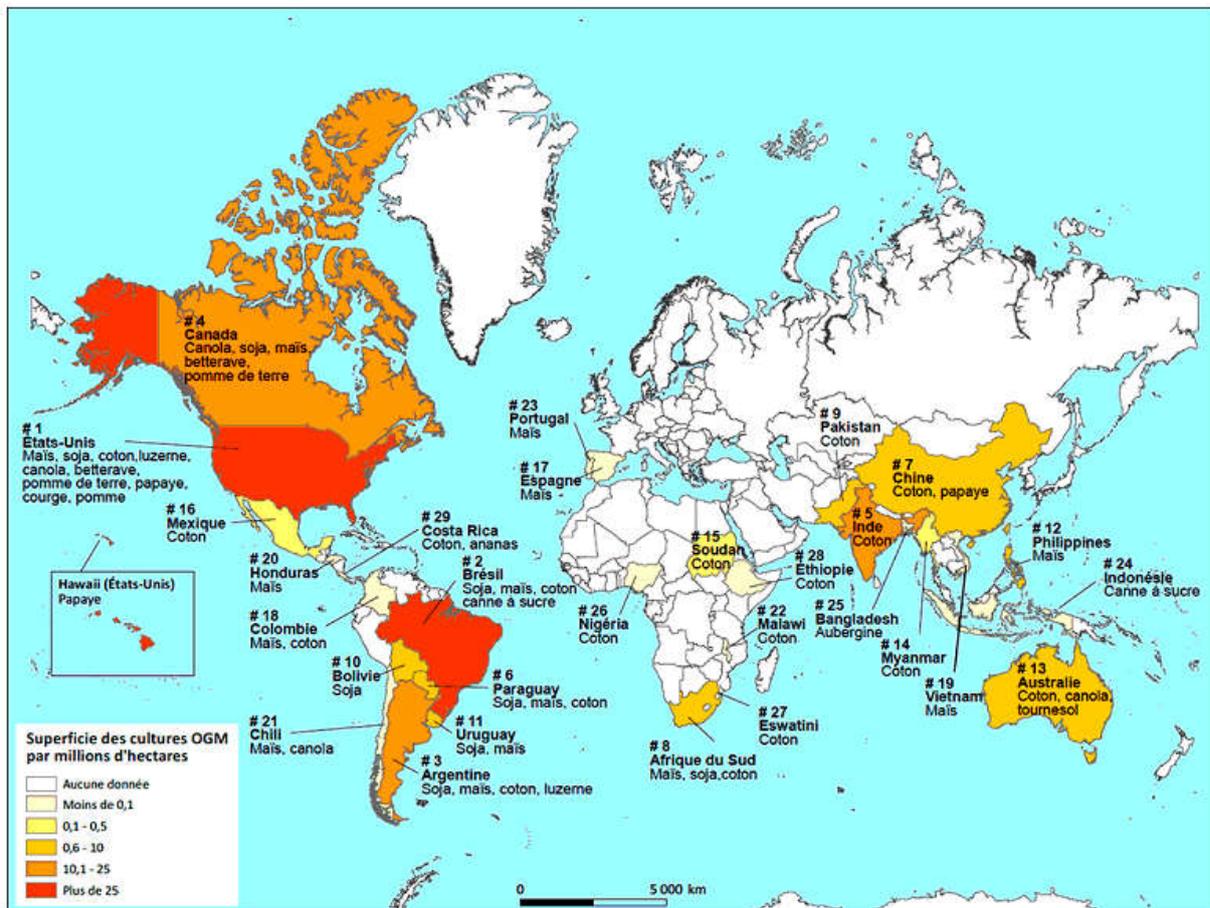


Figure 8: Pays producteurs de cultures OGM en 2019

4.1. Situation en Union européenne (UE)

Deux pays de l'Union Européenne (UE), soit l'Espagne et le Portugal, ont planté 111 883 hectares de maïs GM en 2019 ce qui représente une baisse de 7,5 % par rapport à 2018. Durant cette période, l'Espagne a cultivé 96 % du maïs GM européen y allouant 107 130 hectares.

4.2. Prévisions mondiales pour l'utilisation des cultures GM

Jusqu'à maintenant, les modifications apportées aux plantes GM avaient principalement comme objectif d'améliorer leurs performances agronomiques. *L'International Service for the acquisition of agri-biotech applications* (ISAAA) prévoit que de plus en plus de modifications génétiques seront effectuées dans un autre but: celui de mieux répondre aux préférences et aux besoins nutritionnels des consommateurs. Elle prévoit aussi une diversification des méthodes utilisées pour mettre au point des OGM.

En 2016, plusieurs plantes, avec des caractères nouveaux, ont été évaluées en champs.

Tableau I: Nouvelles espèces GM testées par pays en 2016

Pays	Nouvelles espèces GM testées
Philippines et Bangladesh	Riz doré enrichi de bêta-carotène
Ouganda	Banane GM résistante au flétrissement causé par le Fusarium Pomme de terre résistante au mildiou
Australie	Blé GM résistant aux maladies, tolérant à la sécheresse et à la composition en huile modifiée
Royaume-Uni	Blé avec haut rendement en biomasse
Union Européenne	Pomme de terre à teneur réduite en acrylamide, résistante au mildiou et aux nématodes Caméline enrichie en oméga-3
Inde	Canne à sucre tolérante à la sécheresse Pois chiche résistant aux insectes Moutarde GM

Finalement, à ce jour, les différents organismes de régulation n'ont pas tous établi si les plantes améliorées génétiquement avec des technologies d'édition du génome (ex. l'outil « Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées » en anglais *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR), permettant de modifier le génome, seraient considérées comme des OGM ou non. Malgré cela, l'International service for the acquisition of agri-biotech application affirme que les progrès récents à ce sujet en font une avenue prometteuse pour le développement des biotechnologies agricoles. De nombreux produits issus de cette technologie devraient être commercialisés d'ici 2020.

Chapitre II : Les différentes stratégies de transgénèse

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. 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 (Figure 9).

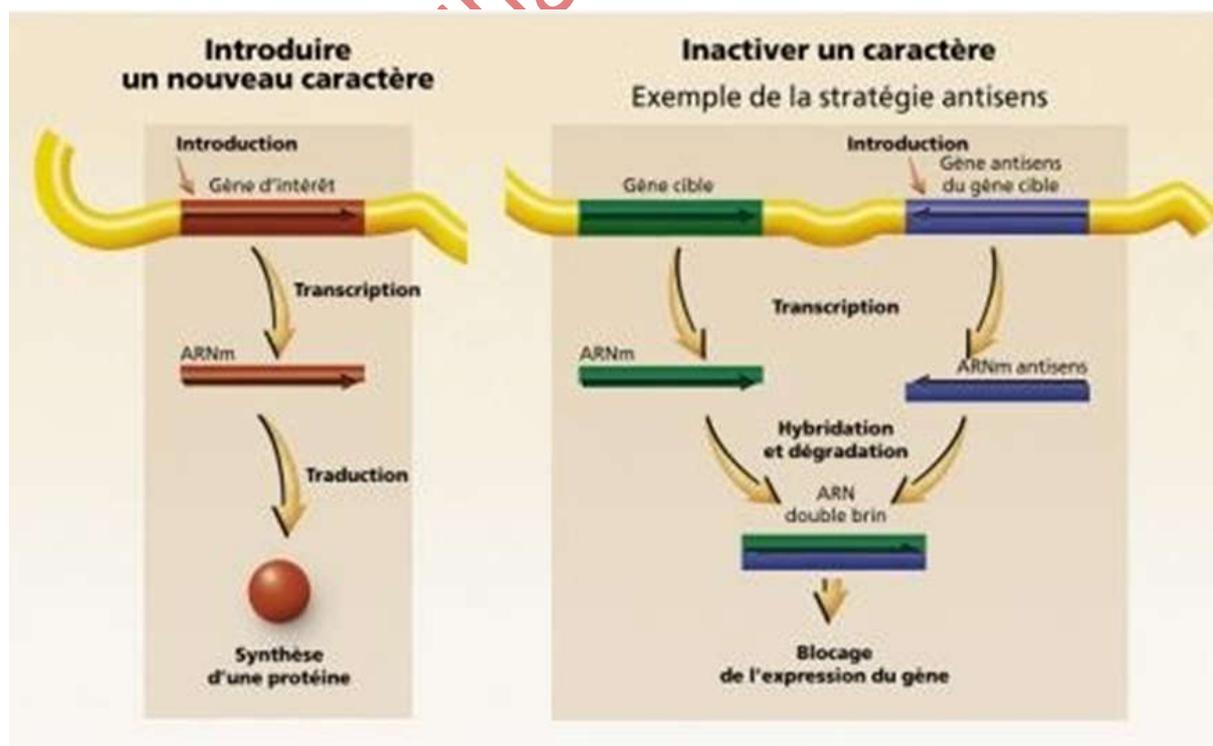


Figure 9 : Transgénèse : différentes stratégies

3. Etapes de la transgénèse

Etape 1 : Identifier, isoler, intégrer et multiplier un gène d'intérêt

La première étape est l'identification 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. Le gène d'intérêt peut provenir de tout organisme vivant, plante, animal ou bactérie puisque le code génétique est universel. Il doit ensuite être isolé de l'organisme donneur. Il est intégré dans une construction génétique 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 (Figure 10).

Etape 2 : Transférer le gène

Il y a plusieurs méthodes pour introduire un gène dans une cellule :

a- 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 génétique introduite dans la bactérie (rendue avirulente au préalable) sera transférée dans la plante et intégrée à son génome. C'est la technique la plus couramment utilisée.

b- Transfert direct

Cette technique fait intervenir :

- ✓ soit une projection d'ADN dans les cellules de la plante par l'utilisation d'un canon à particules qui projette dans les cellules des microparticules enrobées d'ADN (biolistique),
- ✓ 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. Par exemple, chez le tabac et la tomate, on utilise des disques foliaires ; chez la pomme de terre, la transformation génétique peut se faire sur des protoplastes.

Etape 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 pour confirmer l'insertion de la construction génétique dans leur génome. Des analyses moléculaires sont conduites dans ce sens. Des études sur l'expression du gène ont lieu à plusieurs stades, ce qui permet de caractériser le niveau d'expression et le comportement de la plante exprimant le nouveau caractère.

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 la matérielle élite et d'obtenir de nouvelles variétés commerciales exprimant ce caractère.

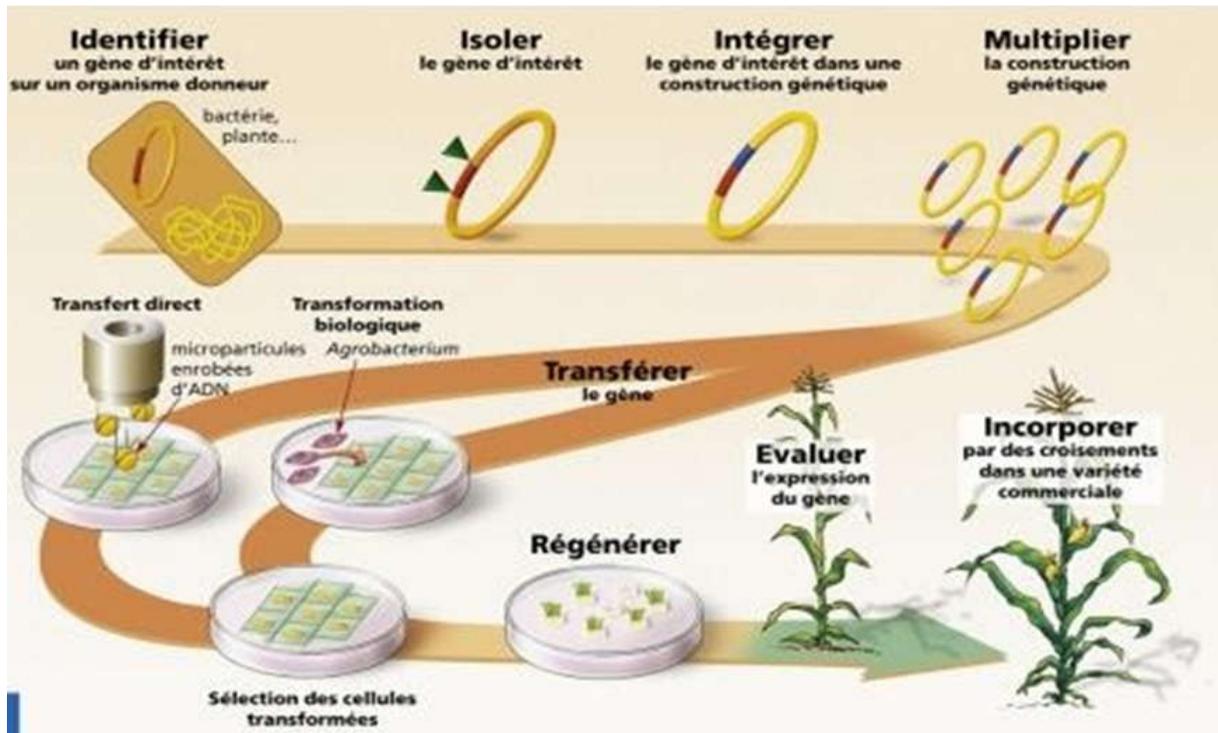


Figure 10: Les étapes de la transgénèse (Clark , 2005)

4. 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 pour cette protéine. Par exemple, chez une bactérie, *Bacillus thuringiensis*, utilisée en pulvérisation pour lutter contre certains papillons ravageurs des cultures de maïs, on a découvert le gène qui permet la production chez la bactérie d'une protéine qui se transforme en toxine dans le tube digestif de la pyrale. C'est ce gène d'intérêt qui a ensuite été isolé à l'aide d'enzymes de restriction.

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

Le gène d'intérêt seul ne peut pas s'exprimer dans la cellule végétale.

➤ Séquences régulatrices

Il est nécessaire de lui ajouter des signaux de régulation. La présence d'un promoteur devant la séquence codante du gène d'intérêt est indispensable. C'est une séquence située en amont du gène, responsable de la transcription de l'ADN. Une séquence terminateur est également indispensable. Située en aval, elle signale la fin de la séquence codante. D'autres séquences peuvent être ajoutées. Elles permettent de cibler le lieu d'accumulation du produit du gène dans la plante, et de réguler la force de son expression (Figure 11).

➤ Gènes marqueurs

Les gènes marqueurs 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 marqueurs de résistance à des antibiotiques ou à des herbicides.

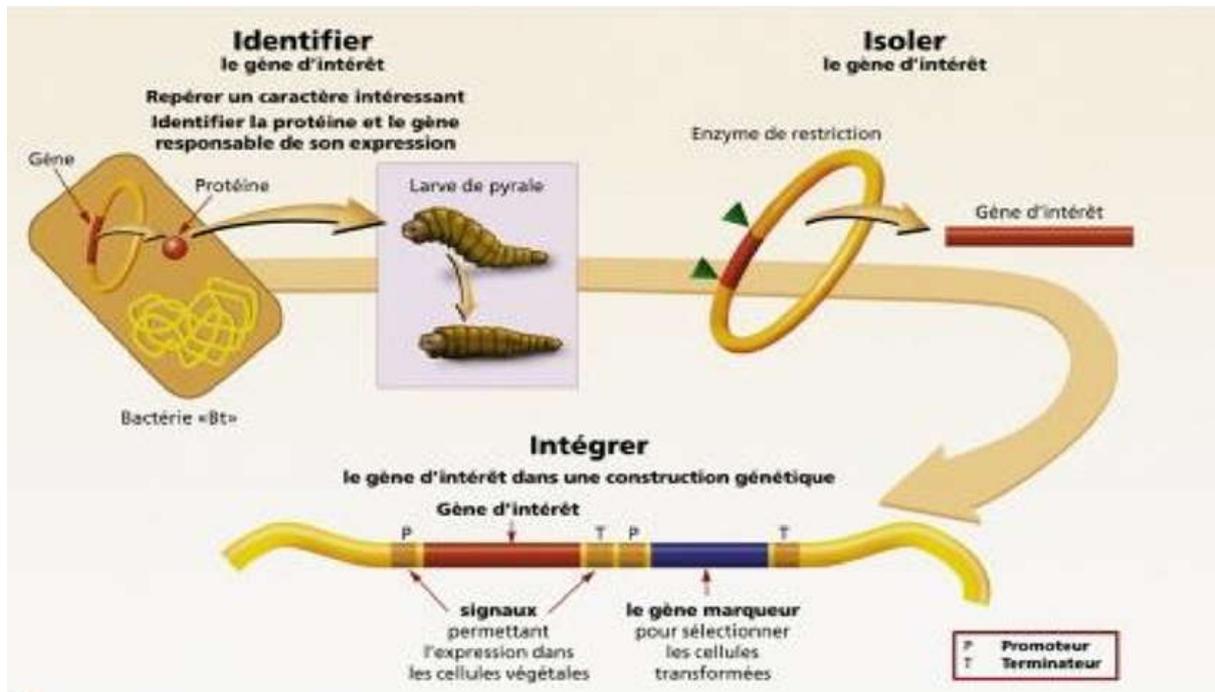


Figure 11 : Réalisation de la construction génétique

5. Multiplication de la construction génétique : le clonage

Pour insérer un gène dans une cellule végétale il est nécessaire d'avoir de nombreuses copies de celui-ci. Le clonage permet d'obtenir une grande quantité de copie d'un gène souhaité.

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 est ensuite réintégré dans des bactéries hôte, il s'agit le plus souvent de la bactérie *Escherichia coli*. Par culture de cette bactérie, on obtient alors une multiplication rapide du plasmide. On parle de clonage du gène ou de la construction génétique, car on dispose ainsi de nombreuses copies du gène (Figure 12).

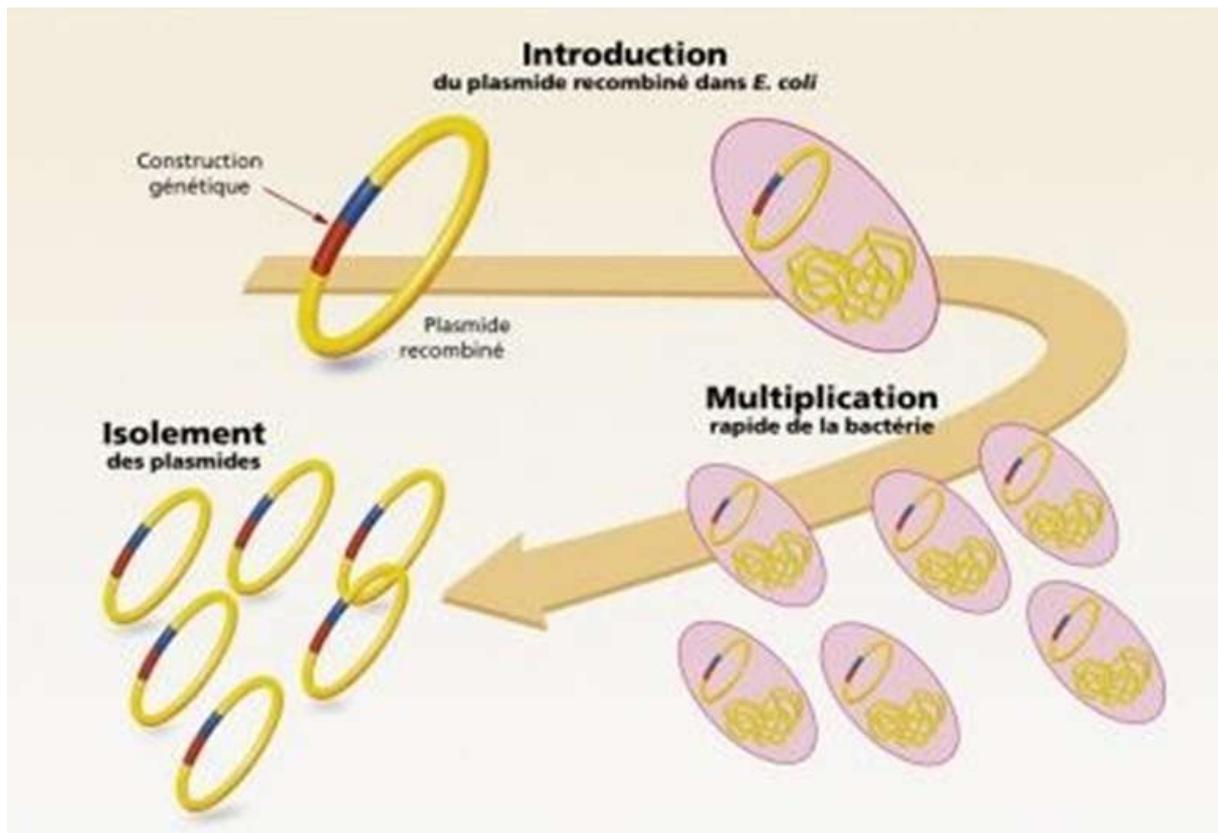


Figure 12: Multiplication de la construction génétique : le clonage

<http://elearning.centre-...>

Chapitre III : Technique de construction des plantes transgéniques (exemple le tabac)

Introduction

La transgénèse végétale permet l'introduction d'un fragment d'ADN dans le génome de la plante, conférant ainsi à celle-ci de nouvelles propriétés. Cette nouvelle plante est alors qualifiée de « plante transgénique » ou d'organisme végétal peut avoir diverses origines (végétale, bactérienne ou animale). Si ce fragment porte un gène, ce gène sera qualifié de transgène. Le fragment intégré de façon stable dans le génome est ensuite transmis à la descendance de la plante.

La création des plantes transgéniques est intéressante tant pour l'amélioration des plantes ou les biotechnologies végétales que pour la recherche fondamentale.

Une des méthodes de l'amélioration classique des plantes consiste à regrouper par croisements et sélections, dans une même plante, certains caractères d'intérêt et donc les gènes correspondants, présents dans l'espèce ou dans une espèce voisine. Cette pratique conduit généralement à l'introduction d'une portion de taille variable d'un génome. Les progrès de la biologie moléculaire et du génie génétique permettent ainsi d'envisager une amélioration ciblée par transfert de gènes spécifiques « naturels » provenant de la même espèce ou d'une espèce voisine. Ainsi, le gène RB de *Solanum bulbocastanum*, une espèce mexicaine de pomme de terre cultivé par génie génétique.

Ce transfert de gène a conféré à cette variété une bonne tolérance à *Phytophthora infestans*, champignon responsable du mildiou. Les outils du génie génétique permettent également la création de nouveaux gènes constitués de séquences d'origine diverse, gènes pouvant être responsables de nouveaux caractères qui pourront ensuite être introduits dans les espèces d'intérêt. Ainsi la production de végétaux génétiquement modifiés peut être motivée par les mêmes objectifs agronomiques et économiques qui sous-tendent l'amélioration classique (par sélection).

Les gènes utilisés jusqu'à présent en transgénèse végétale permettent de rendre les plantes tolérantes à des herbicides ou à des insectes, d'améliorer la qualité des produits, etc. les principales cultures concernées sont le soja, le maïs, le cotonnier et le colza. La production de protéines recombinantes à visée thérapeutique (sérum thérapeutique (sérum albumine humaine, hémoglobine, lactoferrine, anticorps, vaccins, etc.) par les plantes transgéniques (molecular farming) est une autre application en cours de développement. La production de protéines d'origine animale peut s'avérer plus efficace dans les cellules végétales que dans les

cellules bactériennes (meilleur respect de la conformation et du repliement des protéines, meilleure maturation).

En recherche fondamentale, la transgénèse permet de générer du matériel végétal qui peut ensuite être utilisé pour étudier la régulation et les fonctions des gènes, le développement ou la physiologie de la plante.

Les méthodes de clonage des gènes qui ont été à l'origine de l'industrie des biotechnologies pharmaceutiques ont aussi entraîné l'apparition de nouvelles sociétés qui essaient d'améliorer la qualité des produits agricoles. Le succès de ces firmes repose sur la poursuite de la recherche dans le domaine du contrôle des processus biologiques chez les plantes et les animaux et sur le développement de produits agricoles recombinants qui soient utiles et sûrs. Au contraire des expériences de génie génétique qui sont réalisées au laboratoire, les produits agricoles recombinants doivent être mis en circulation dans l'environnement.

Les virus des plantes représentent un sérieux problème pour la plupart des grandes productions agricoles. Les infections peuvent entraîner une diminution de la croissance, du rendement des récoltes et de la qualité. Une manipulation génétique courante, appelée « protection croisée » consiste à infecter une plante par une souche de virus dont les effets sont peu sévères. Ce traitement protège la plante contre l'infection par les souches plus virulentes. Bien que les mécanismes de cette protection croisée soient mal connus, il semble qu'une protéine virale particulière soit responsable de l'effet protecteur. Le clonage de l'ADNc (ADN **complémentaire** ou, Acide désoxyribonucléique **complémentaire**, est un simple brin artificiellement synthétisé à partir d'un ARNm, représentant ainsi la partie codante de la région du génome ayant été transcrite en cet ARNm) codant pour les protéines de virus des plantes a donné aux biologistes moléculaires des plantes l'occasion d'étudier plus en détail ce phénomène.

La première expérience fut effectuée sur le Tabac. Le virus de la mosaïque du tabac (TMV) est un virus à ARN dont le génome est long de 6,5 kb. Le clonage de son ADNc a permis de montrer que le génome du TMV code pour quatre polypeptides: deux sous-unités d'une réplicase. Une protéine d'enveloppe et une protéine importante pour le passage d'une cellule à une autre. Des plantes transgéniques exprimant la protéine de l'enveloppe (CP) du (TMV) ont été produites par transfert de gène par l'intermédiaire d'*Agrobacterium*.

Lorsque la plante transgénique exprimant la protéine CP est exposée au TMV, elle présente une résistance accrue à l'infection. Alors que des plantes normales présentent les

symptômes de l'infection après trois à quatre jours, les plantes transgéniques exprimant CP résistent pendant plus de trente jours. Cependant, le délai avant l'apparition des symptômes est raccourci si la dose du virus est augmentée (Figure 13).

Un tel phénomène s'observe également dans le cadre de la protection croisée naturelle. La capacité d'une plante à résister à l'infection correspond au taux de CP synthétisée. L'agent protecteur est la protéine de l'enveloppe elle-même et non l'ARN viral. Dans certains cas, l'expression de la protéine de l'enveloppe d'un virus proches. Des travaux plus récents ont démontré qu'une protection active des récoltes de pommes de terre, de luzerne et de tomates contre l'infection virale peuvent être obtenue par l'expression de la protéine CP. Les tomates transgéniques ont montré un niveau de résistance comparable lors d'études réalisées en champ, et ont des caractéristiques agronomiques semblables à celles des plantes normales.

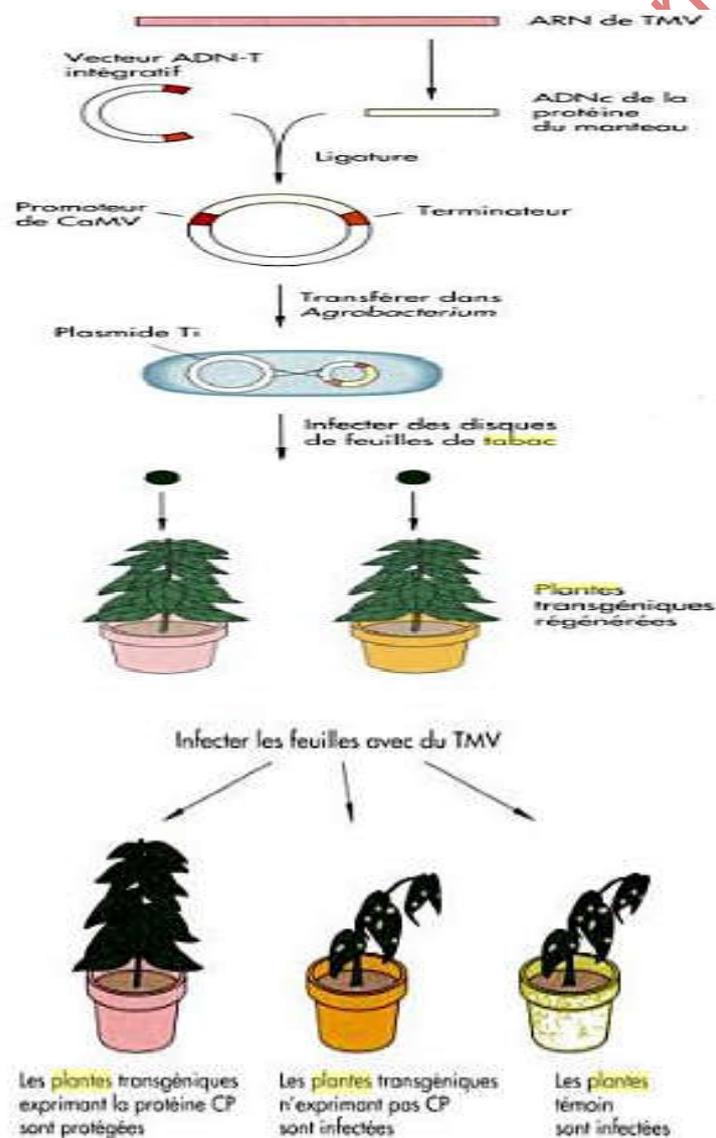


Figure 13 : Tabac génétiquement modifié infecté avec du TMV

L'expression transgénique chez le tabac de l'ADNc de la réplicase du TMV a également permis d'obtenir des plants résistants. De façon surprenante, la protection semble due aux molécules d'ARN transcrites et non à la protéine en un fragment actif de 68000 daltons. La toxine agit en se fixant sur des récepteurs de surface ces cellules de l'intestin moyen et bloquent l'activité de ces cellules. Les premières études ont montré que des plants de tabac et de tomates exprimant le gène de la toxine Bt tuent les larves des vers à cornes du tabac. Cependant, comme le niveau d'expression est très bas, la protection ne joue pas contre les souches d'insectes moins sensibles mais importantes au plan agronomique, comme la larve du coton.

L'exemple de la transformation d'un plant de tabac par un gène résistant à la kanamycine est une bonne illustration pour expliquer les différentes étapes de la transgénèse par *Agrobacterium*. Le principe de la transgénèse repose sur les caractéristiques du plasmide Ti natif (Figure 14) portée par *Agrobacterium tumefaciens* qui est alors utilisé comme un vecteur. Le plasmide natif est responsable de la tumorigenèse des cellules végétales mais grâce à une modification génique, il peut être utilisé pour la transgénèse. Les gènes ONC (Auxine, Cytokinine et Opine) possèdent des fonctions oncogènes pour les cellules végétales.

Ils sont supprimés de l'ADN-T et sont remplacés par le gène d'intérêt. Ceci a pour effet de désarmer le plasmide tout en conservant la possibilité de transférer le gène de la bactérie vers le noyau de la cellule végétale par l'intermédiaire des gènes VIR.

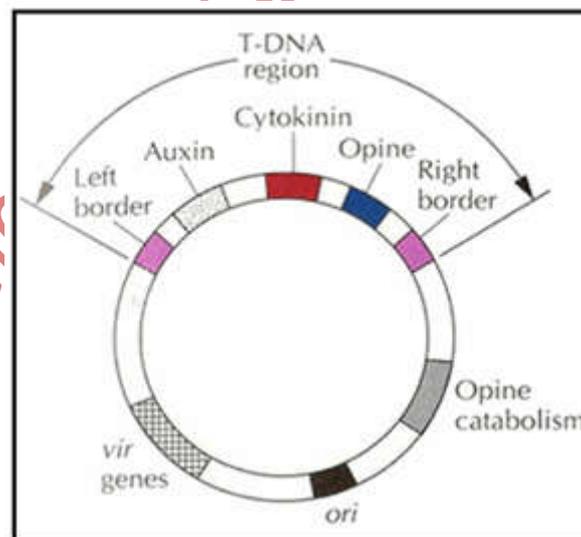


Figure 14 : Carte simplifiée du plasmide Ti natif (Beijersbergen et Hooykaas, 1993)

1. L'obtention de tabac transgénique

Le gène d'intérêt, De manière simplifiée, quatre étapes peuvent être décrites pour obtenir des plants de tabac transformés. Dans un premier temps, la construction génique réalisée en laboratoire associe trois parties :

La séquence codante du gène d'intérêt identifié et isolé, est ici une séquence codante conférant la résistance à la kanamycine (néomycine phosphotransférase NPT);

- un promoteur NOS (nopaline synthétase) de l'ADN-T d'*Agrobacterium* ;
- un terminateur NOS 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*.

Dans un deuxième temps, la bactérie transformée est incubée avec des fragments découpés de feuille de tabac. Les cellules végétales blessées permettent de stimuler le transfert de gène par *Agrobacterium*. Les fragments de feuilles sont ensuite incubés en présence de kanamycine et seules les cellules transformées proliféreront et formeront des cals.

Dans une troisième étape, ces cals sont mis en cultures sur des milieux appropriés contenant des phytohormones. Certaines des cellules donneront des bourgeons, qui s'enracineront ensuite pour régénérer des plantes entières.

Pour finir, afin de vérifier que les plantes régénérées sont bien transformées, leurs graines obtenues par autofécondation sont semées sur un milieu contenant de la kanamycine. Statistiquement, 1/4 des plantes ne possèdent pas le gène de résistance : c'est la proportion attendue pour un gène quelconque. Plusieurs possibilités se présentent (Figure 15) :

- Soit des plantes dépourvues de chloroplastes car la kanamycine interfère avec leurs développements. Ces plantes sensibles sont blanches et leur développement est alors arrêté (photosynthèse impossible). Elles meurent.
- Soit des plantes chlorophylliennes normales et 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.

Ce gène introduit se conduit comme n'importe quel autre gène : il fait alors partie du patrimoine génétique de la plante qualifié alors de transgénique. Cependant pour être qualifiée de transgénique il faut que toutes les cellules de la plante possèdent le transgène sinon, il s'agit d'une plante chimère. Des analyses moléculaires au niveau de l'ADN sont aussi pratiquées pour vérifier le transfert du gène (Southern blot, Northern blot, PCR).

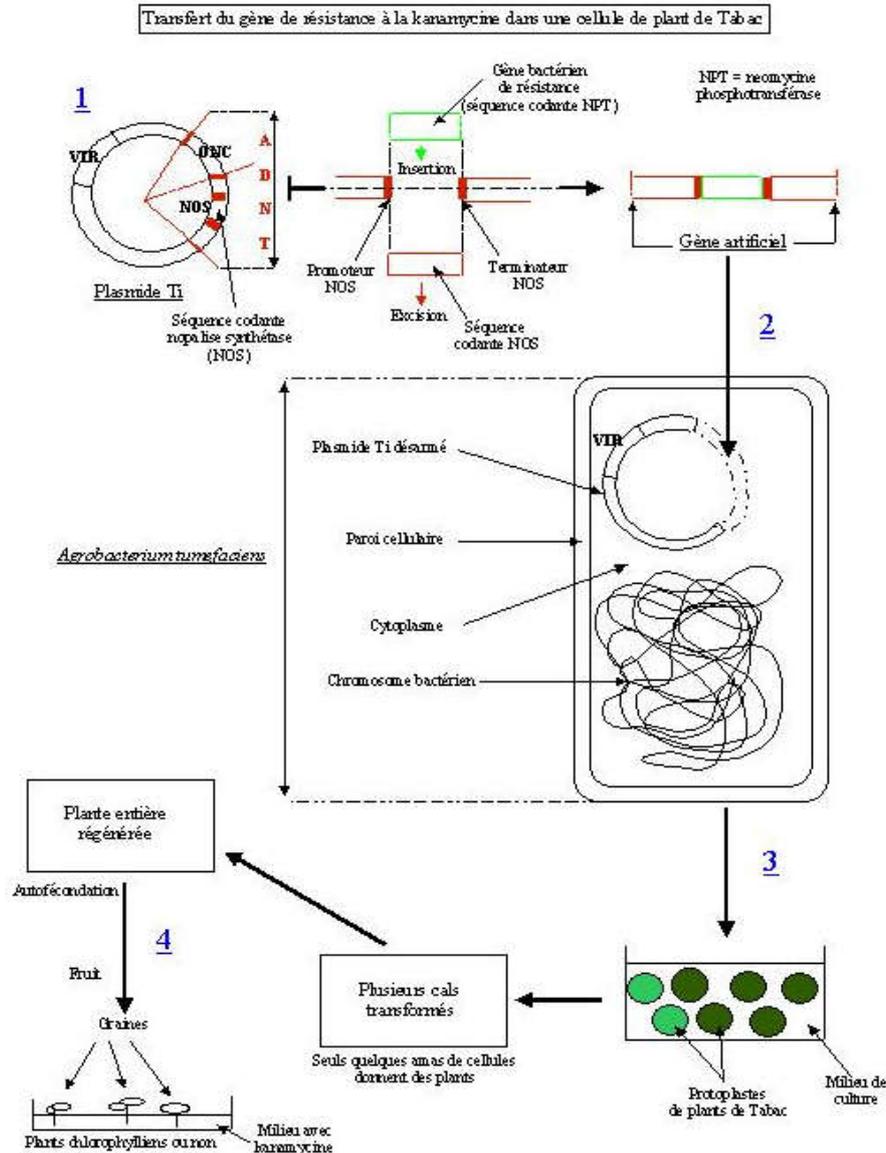


Figure 15: L'obtention de tabac transgénique

- 1 - Réalisation d'une construction génique ou gène artificiel.
- 2 - Recombinaison puis insertion du fragment d'ADN (construction génique) dans le plasmide Ti désarmé - privé de la séquence ONC, fonction oncogène ; Introduction du plasmide Ti modifié dans la bactérie hôte.
- 3 - Transfection du plasmide modifié dans des protoplastes, par *Agrobacterium*
- 4 - Contrôle de l'efficacité du transfert et sélection des organes exprimant le gène transféré.

2. Production de protéines recombinantes dans le tabac

Ce système de production présente les avantages suivants. Le protocole de transformation génétique du tabac est simple et rapide.

Les semences produites par le tabac sont abondantes (jusqu'à 5 g de semences par plante) et permettent de semer de grandes surfaces (1 g de graines suffisent pour 1 hectare). Aucun croisement n'est possible avec des plantes alimentaires et un écimage des plantes est réalisé avant la floraison. Ainsi il n'y a pas de pollen ni des graines qui sont relâchés au champ.

En contrepartie, les taux d'expression sont en général faible (peu de protéines recombinantes par gramme de matière fraîche) et les coûts de récolte et de stockage de la matière foliaire sont très élevés (les feuilles doivent être congelées et stockées à -20°C).

Des vecteurs d'expression simples ont été créés avec des promoteurs chimériques afin d'obtenir une expression importante dans les feuilles (Figure 16).

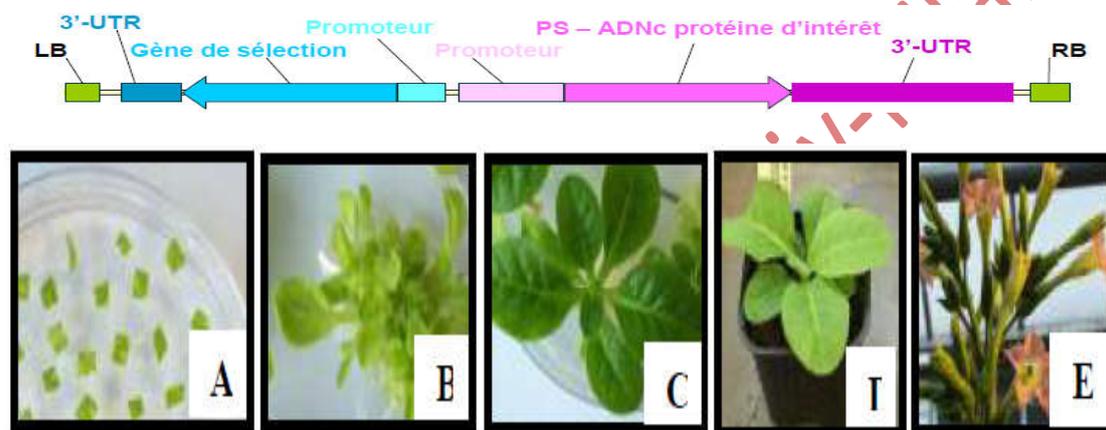


Figure 16 : Quelques photos d'obtention de tabacs transgéniques

Des morceaux de feuilles (A) sont placés en contact avec l'agrobactérie portant le gène d'intérêt. Les cellules qui ont intégré l'ADN-T des agrobactéries vont se multiplier et se différencier en plantules (B). Ces plantules vont être bouturées pour favoriser le développement d'un système racinaire (C). Elles sont ensuite transférées à la serre (D). Les plantes sont criblées pour leur capacité à produire la protéine recombinante puis menées à graines (E).

3. Exemples de trois protéines recombinantes produites dans les plantes transgéniques de tabac

a- Production d'allergènes dans le tabac

La produit la protéine Der p 1 issue de *Dermatophagoides pteronyssinus* (acarien de la poussière). Cette protéine est la cause principale des allergies aux acariens de la poussière. Une production importante de la protéine Der p 1 recombinante est nécessaire pour envisager la désensibilisation des patients allergiques. L'allergène recombinant Der p 1 a été purifié à partir de plantes et testé *in vitro* (réactivité aux IgE, activation des cellules basophiles et

prolifération de lymphocytes T issus de sera de patients sensibilisés aux acariens de la poussière). Les résultats obtenus ont montré que le Der p 1 recombinant a des propriétés similaires à celles du Der p 1 natif issu des acariens.

b- Production de collagène humain dans les feuilles de tabac

Des tabacs transgéniques exprimant le collagène ont été produits. Le collagène produit et purifié, forme dans les conditions adéquates une triple hélice stable ($T_m = 30^\circ\text{C}$) et des fibrilles *in vitro* (Figure 17). A partir du meilleur expresseur, des suspensions cellulaires ont été initiées. Le collagène n'a pas été détecté dans le milieu. Des expériences d'immunomarquage ont été réalisées avec les feuilles de tabacs transgéniques produisant le collagène (le collagène s'accumulait dans le cytoplasme des cellules dans des petites vésicules). Malgré la présence d'un peptide signal qui oriente la protéine recombinante vers la voie de sécrétion, il est possible que la protéine recombinante reste à l'intérieur de la cellule.

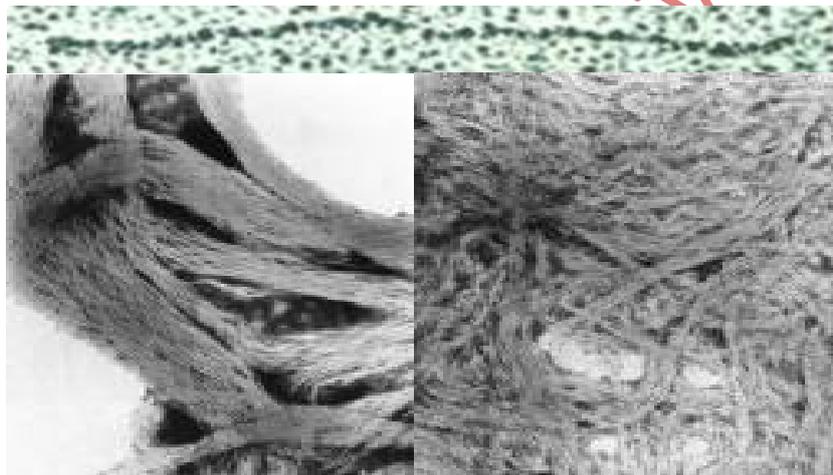


Figure 17 : Production de collagène humain dans les feuilles de tabac

c- Importance du ciblage des protéines au sein de la cellule végétale (cas de la lipase gastrique)

Des tabacs transgéniques exprimant la lipase gastrique de chien ont été produits. La lipase est une molécule potentielle du traitement des insuffisances pancréatiques exocrines. A la chaîne codante de l'ADNc de la lipase, deux peptides signaux différents ont été ajoutés afin d'avoir une protéine localisée soit dans la vacuole soit à l'extérieur de la cellule. Dans les deux cas, une protéine recombinante active et glycosylée a été obtenue. Toutefois la maturation protéolytique et l'activité spécifique des protéines recombinantes dépendent de la compartimentation subcellulaire. En effet, en sécrétion, 70% des protéines sont matures et 30% sont déléetées de trois acides aminés. Lors du ciblage dans la vacuole, aucune forme mature de la protéine n'a été détectée alors que la délétion de 4, 8 et 54 acides aminés donne respectivement des proportions de 40, 10 et 50% des protéines recombinantes.

Chapitre VI. *Agrobacterium* et le transfert de gènes chez les végétaux

1. Transfert dans les cellules végétales d'informations, de facteur(s) inducteur(s) de tumeur

1974: l'équipe de Jeff Schell et Marc Van Montagu en Belgique a isolé un plasmide d'*Agrobacterium* contenant les gènes responsables de la formation des tumeurs (tumor inducing plasmid; Ti).

1977: Mary-Dell Chilton, Eugene Nester et Milton Gordon ont montré que la transformation des cellules végétales par *Agrobacterium tumefaciens* résulte de l'intégration dans leur génome d'un fragment d'ADN (appelé ADN-T pour ADN transféré) issu des plasmides Ti. Les gènes portés par l'ADN-T ne s'expriment pas dans *Agrobacterium*, mais seulement dans le noyau des cellules végétales (Figure 18).



Figure 18 : Détail d'une galle du collet

Une information génétique est transférée de la bactérie dans le génome de la cellule végétale.

Les gènes transférés sont exprimés dans la cellule végétale. Le produit de ces gènes

- 1) stimule la croissance des cellules (tumorigenèse)
- 2) crée une source amplifiable d'azote et de carbone au profit de la bactérie sous forme d'opines (Figure 19).

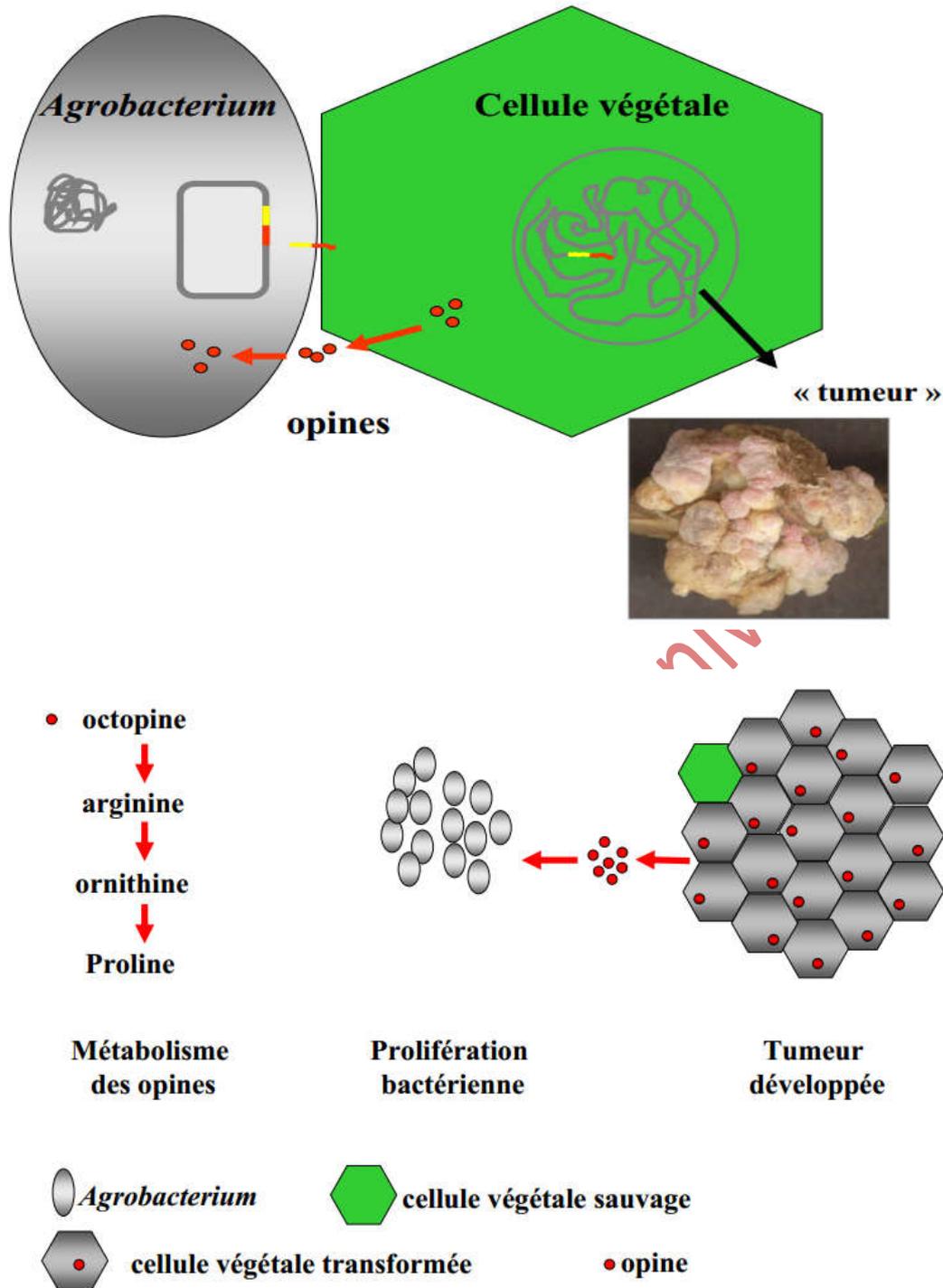


Figure 19 : Transfère l'information génétique dans le génome de la cellule végétale.

- *Agrobacterium tumefaciens* est capable de modifier génétiquement un autre organisme pour assurer sa survie.
- Amplification d'une biomasse végétale, production de nouveaux métabolites par cette biomasse, utilisation de ces métabolites par l'initiateur du processus.

2. Structure du génome d'*A. tumefaciens* C58

La souche modèle du biovar 1, *Agrobacterium tumefaciens* C58 a été complètement séquencée deux fois. Elle possède quatre réplicons : un chromosome circulaire (CcC58, 2,8Mb) comportant la plupart des gènes impliqués dans les processus biologiques essentiels à la survie de la bactérie (synthèse d'acides nucléiques, traduction, métabolisme des acides aminés ...), un chromosome linéaire (LcC58, 2Mb), un plasmide cryptique At (pAtC58, 0,55Mb) et un plasmide Ti (« Tumeur-inducing », pTiC58, 0,2Mb). Ce dernier plasmide porte le fragment d'ADN qui est transféré dans la cellule végétale, appelé ADN-T (« Transferred-DNA ») et les gènes de virulence *vir* qui régissent l'intégration de l'ADN-T dans la cellule hôte.

Le génome d'*A. tumefaciens* C58 contient 5419 gènes codant pour des protéines dont plus de 60% possèdent une fonction putative attribuée par homologie de séquences (Figure 20). Les familles les plus représentatives sont les adénosines triphosphates (ATPases) et les transporteurs de type ABC (ATP binding cassette).

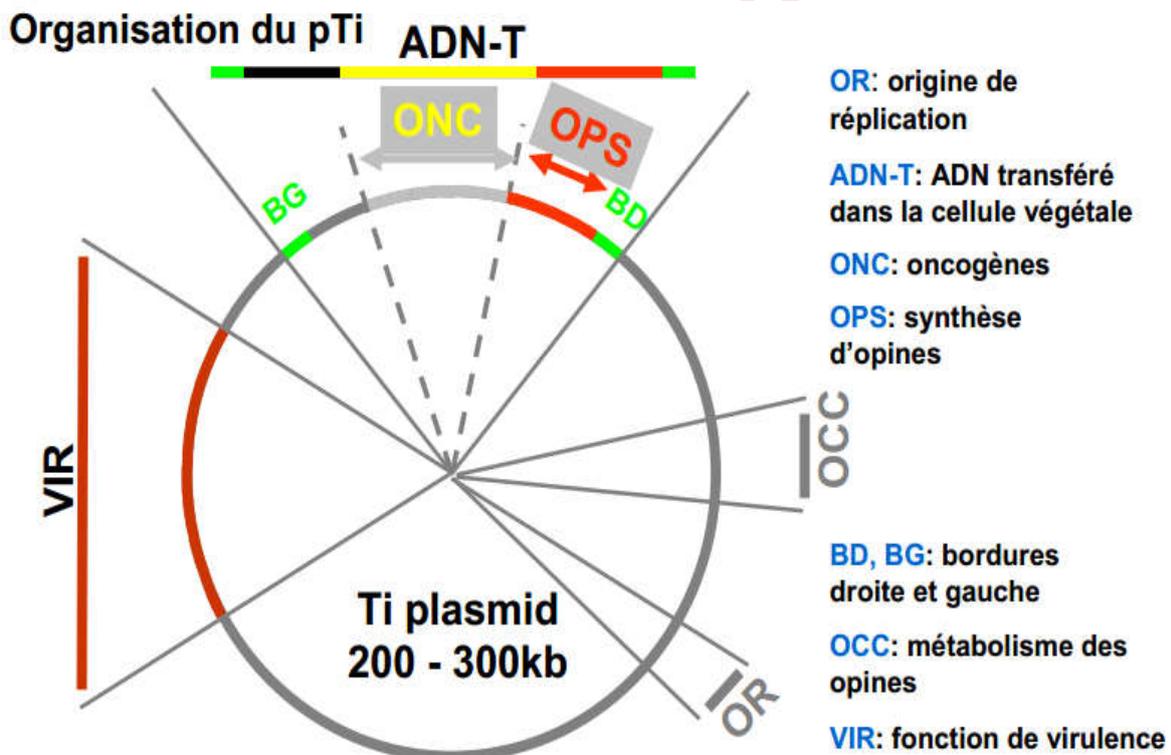


Figure 20 : *Agrobacterium tumefaciens* : mécanisme de transfert de l'ADN-t

3. Processus d'infection d'*Agrobacterium tumefaciens*

Le processus de transgénése mise en place par *A. tumefaciens* grâce à la présence du plasmide Ti a permis la mise en évidence du lien entre la tumorigenèse induite par *A. tumefaciens* et l'intégration de son ADN-T dans le génome de la cellule végétale infectée. Ce mécanisme de transgénése fait intervenir deux groupes de gènes localisés à des endroits différents et régulés de façon distincte. Plus schématiquement, le cycle d'infection d'*A. tumefaciens* se décompose en trois étapes :

- ❖ la reconnaissance bactérie / hôte,
- ❖ le transfert de l'ADN-T,
- ❖ l'expression des gènes de l'ADN-T qui induisent le développement de la tumeur.

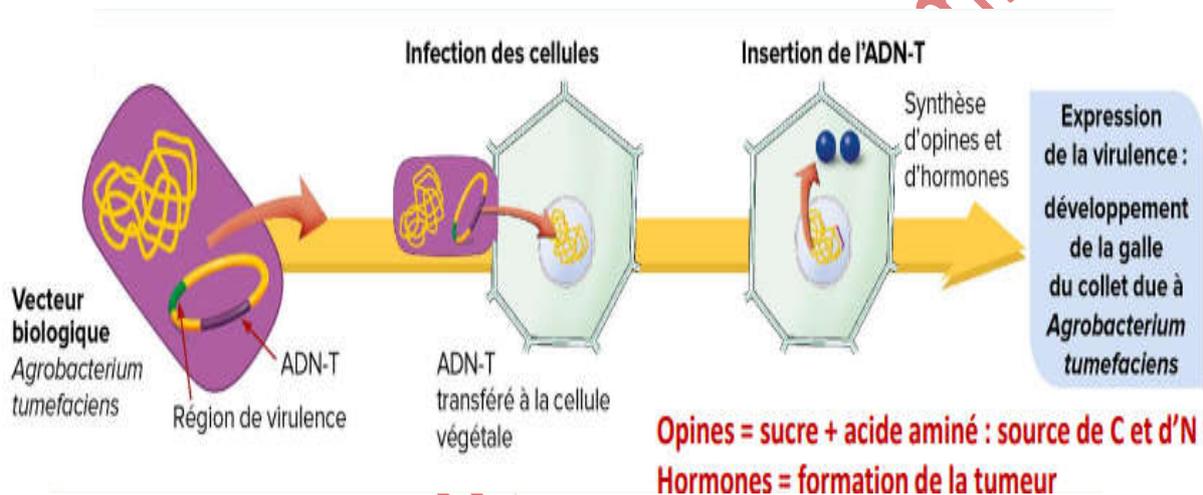


Figure 21 : Transfert naturel de l'ADN-t par *Agrobacterium tumefaciens*

3.1. Reconnaissance bactérie / hôte

a. Fixation aux cellules hôtes

Lors d'une blessure, la plante libère des molécules chimio-attractantes telles que des sucres et des composés phénoliques attirant ainsi la bactérie qui se déplace vers la blessure à l'aide de ses flagelles en suivant le gradient de concentration. Pour établir un contact physique avec son hôte, *A. tumefaciens* reconnaît des protéines localisées sur la paroi végétale et apparentées à la vitronectine, protéine impliquée dans le maintien de la structure et dans la cohésion des cellules végétales. Ces protéines sont reconnues par des polysaccharides acylés de type 1-2 glucane, synthétisés et excrétés par les gènes du chromosome bactérien tels que *exoC*, *chvA* et *chvB*. L'interaction du polysaccharide avec la protéine de type vitronectine

entraîne la synthèse de filaments de type cellulose stabilisant et renforçant ainsi l'attachement de la bactérie sur la cellule hôte (Figure 22).

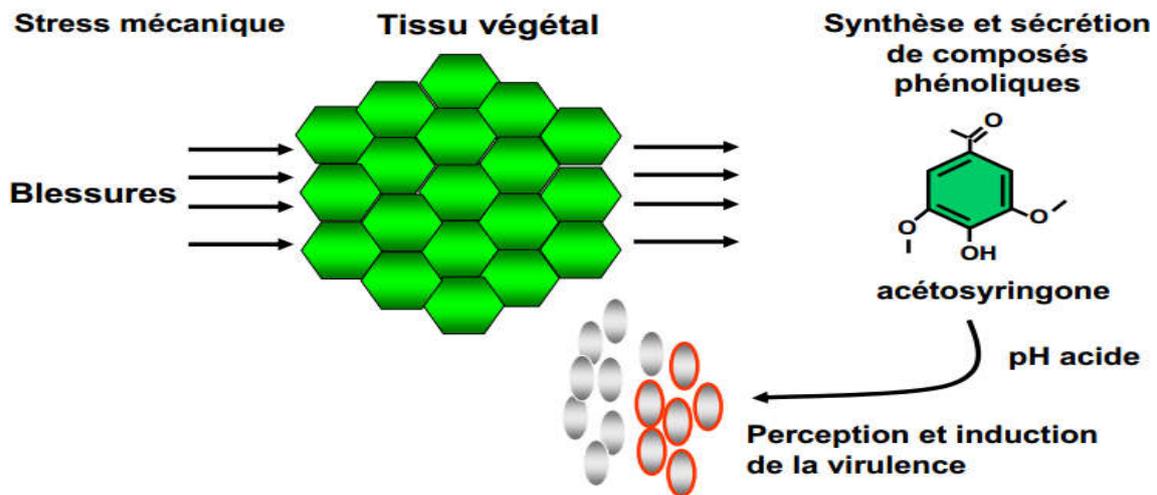


Figure 22 : Synthèse des molécules chimio-attractantes lors de la blessure

b. Activation des gènes de virulence

L'activation des gènes de virulence *vir* est une étape indispensable pour le processus de transgénèse. Les gènes *vir* présents sur la partie non transférable du plasmide Ti ont besoin d'être induits par l'exsudât des cellules blessées pour être exprimés. Les composés phénoliques synthétisés par la plante sont reconnus par la protéine VirA (récepteur présent dans la membrane interne de la bactérie). Après fixation des composés, la protéine VirA s'auto-phosphoryle puis phosphoryle la protéine régulatrice cytoplasmique VirG qui se fixe sur la boîte *vir* qui active la transcription des promoteurs des gènes *vir*. Cette dernière étape permet de stabiliser le contact avec l'hôte et permet d'engager le processus de transfert du T-DNA (Figure 23).

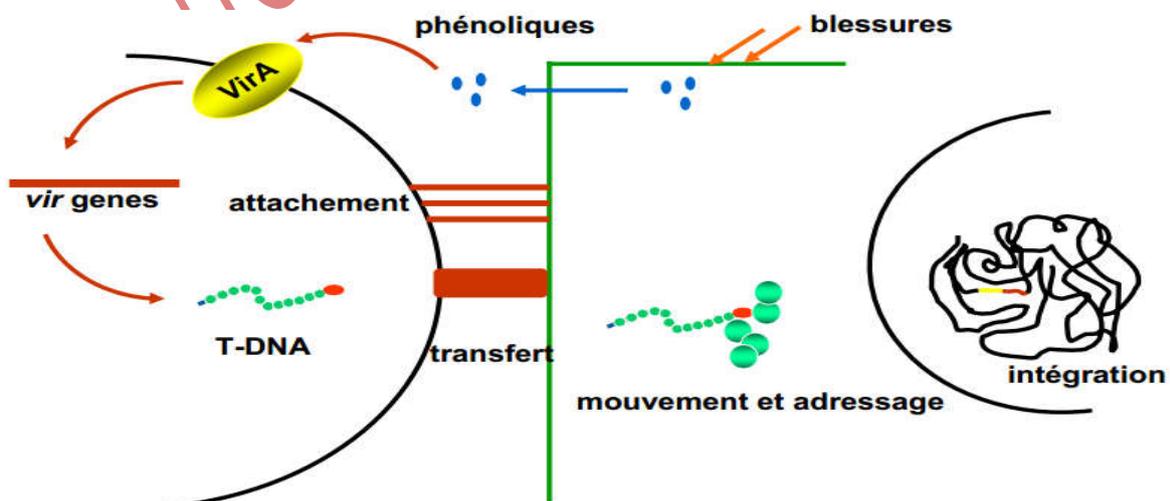


Figure 23 : Activation des régions vir

3.2. Transfert T-DNA

3.2.1. Production du brin T

L'expression des gènes *vir* conduit à la production d'un brin d'ADN-T. Pour cela, les endonucléases VirD1 et VirD2 vont agir spécifiquement pour couper un fragment de plasmide Ti. Grâce à son activité hélicase, la protéine VirD1 sépare les deux brins d'ADN-T. La protéine VirD2 quand à elle clive l'ADN-T au niveau des séquences répétées de 25 nucléotides, spécifiques des régions flanquantes de ce fragment. VirD2 se fixe covalamment à l'extrémité 5' du brin d'ADN-T. Le complexe VirD2/ADN-T se sépare du reste du plasmide, et ainsi le brin T est formé et il va pouvoir s'orienter afin d'être transféré dans la cellule hôte pendant que le plasmide Ti est régénéré à l'aide de la machinerie de réparation de l'ADN de la bactérie.

3.2.2. Translocation du brin T dans la cellule végétale

Le complexe brin T/ VirD2 ainsi que quatre autres protéines effectrices bactériennes (VirE2, VirE3, VirF et VirD5) sont transférés dans la cellule végétale. Ce transfert requiert une machinerie protéique particulière qui forme un canal entre la bactérie et la cellule hôte. Cette structure est un système de sécrétion de type IV composé d'un assemblage de 12 protéines : 11 protéines VirB et de la protéine VirD4.

La protéine VirB1 hydrolyse localement le peptidoglycane de la membrane bactérienne, puis les autres protéines s'assemblent autour de VirD4 pour former le transporteur T. Le complexe multiprotéique formé est composé en trois sous groupe. Le pilus T composé principalement de VirB2 et des ATPases VirB4, VirB11 et VirD4 fournissent l'énergie nécessaire à l'assemblage du transporteur T et au transfert du brin T. Les protéines VirB6 à VirB10 constituent le canal de translocation traversant les membranes bactériennes. Enfin les protéines VirB2, VirB5 et VirB7 sont impliquées dans le contact bactérie/ cellule végétale.

3.2.3. Intégration dans le génome de l'hôte

A son entrée dans cellule végétale, le brin T est recouvert de protéines VirE2 afin de le protéger des nucléases végétales et de lui conférer la structure nécessaire pour son transport jusqu'au noyau de la cellule hôte. On le nomme complexe T. Pour le moment, les données expérimentales présents dans la littérature ne permettent pas de déterminer précisément où se forme le complexe T mais la possibilité que le complexe se forme avant ou lors du passage dans le canal de translocation est l'hypothèse la plus récente.

3.2.3.1. Importation du complexe T dans le noyau

Dans le cytoplasme de la cellule végétale, le complexe T est dirigé vers le noyau de la cellule à l'aide de protéines cargos telles que la dynéine. De plus, il a été démontré que des protéines de la cellule hôte de la famille des importines se fixent sur les séquences NLS (Nuclear Localisation Signal) de VirD2 et VirE2, facilitant ainsi l'entrée du complexe T dans le noyau. La protéine VirE2 interagit avec la protéine de plante VIP1 (VirE2-Interacting Protein 1). En réponse au stress induit par l'entrée de protéines dans la cellule de plante, VIP1 est activé par phosphorylation par la protéine MPK3. Dans de telles conditions, VIP1 est recrutée dans le noyau où elle y co-transporte VirE2 et donc l'ADN-T.

3.2.3.2. Intégration de l'ADN-T dans le génome végétal

L'intégration de l'ADN-T dans le génome de la plante se fait de façon aléatoire, avec une préférence pour les régions transcriptionnellement actives de la chromatine. Actuellement, deux modèles sont proposés.

Le premier se base sur le principe d'une recombinaison entre l'ADN-T simple brin T et la séquence d'ADN de la plante dans des régions où il y aurait une « micro-homologie ». La présence de VirD2 sur la partie 5' du brin T permettrait la coupure de l'ADN végétal et ainsi l'intégration du brin d'ADN-T.

Au moment de l'intégration du brin d'ADN-T, VirD2 et VirE2 sont décrochés permettant ainsi la synthèse du brin complémentaire de l'ADN-T et l'incorporation d'une copie double brin dans le génome de la plante.

Le deuxième modèle se base sur une recombinaison non homologue (NHEJ : non homologous endjoining) suite à des cassures de l'ADN végétal. Ceci suppose que le brin d'ADN-T est répliqué pour former un double brin T qui s'intègre au niveau d'une cassure dans le génome de la cellule végétale. Cette réplication non homologue explique plus facilement la présence de copies répétées d'ADN-T et la présence fréquente de plusieurs ADN-T d'*Agrobacterium* de souches différentes dans un même génome de cellule végétale (Figure 24).

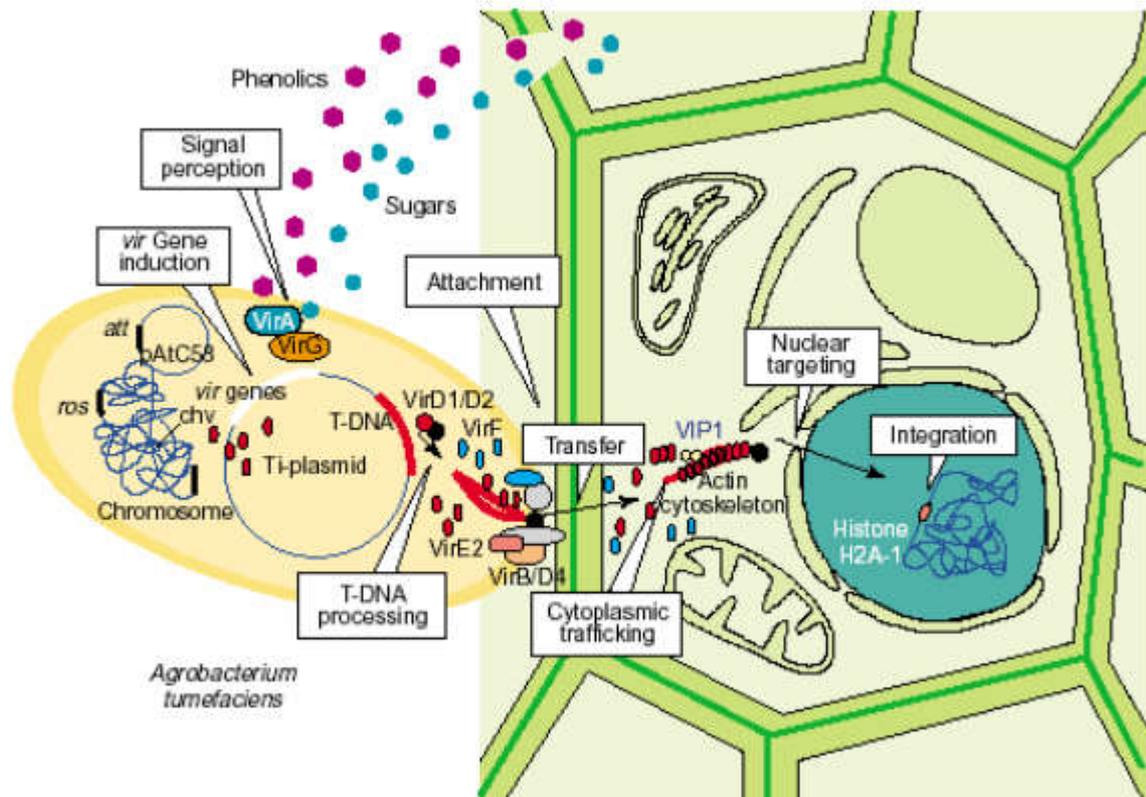


Figure 24: Principales étapes de la transformation génétique d'une cellule végétale par *Agrobactérium* (Gelvin, 2003)

Chapitre V. Vecteurs de transformation

1. Utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* comme vecteur des transgènes

Il faut remédier à 2 contraintes principales

✓ Contrainte 1

Pour éviter le développement de la gale par la plante transformée (qui entraînerait sa mort), on utilise un **plasmide Ti désarmé** est amputé de l'ADN-T, y compris les gènes oncogènes et les séquences bordures. Il comporte un gène de résistance à un antibiotique qui permet de sélectionner ce plasmide 'désarmé' là où il se trouve. Aussi on peut y mettre à la place un **gène d'intérêt** (GI) avec un gène marqueur (gène de sélection, GS). 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 (Figure 25).

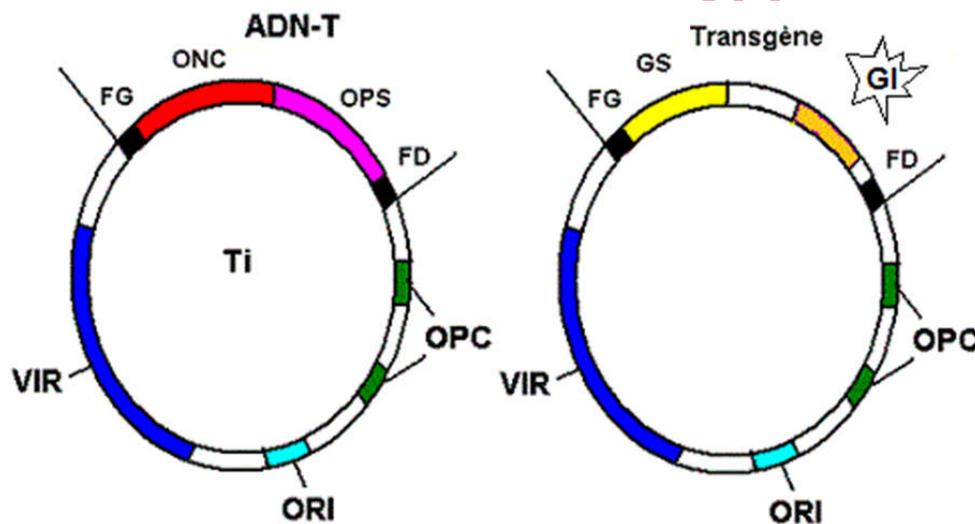


Figure 25 : Plasmide Ti désarmé

Les gènes *vir* sont activés par trois types de signaux chimiques que la plante relâche en cas de blessure. Ils sont :

- 1/ **composés phénoliques** dérivés du syringol (acétosyringone).
- 2/ **monosaccharides** tels que glucose et acide glucuronique
- 3/ **pH acide**.

✓ Contrainte 2

Le plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* étant de **grand taille (environ 200 Kb, difficile à manipuler *in vitro*)** et ne possède pas de site unique de clonage. Il est donc nécessaire de cloner le gène d'intérêt dans un petit plasmide d'environ 10 Kb (de *E. Coli*, par exemple) qui présente une zone d'homologie avec Ti et qui va porter l'ADN-T recombiné

(**construction génétique**) + bordures gauche et droite de l'ADN-T. On distingue deux systèmes de transfert.

2. Système de transfert par co-intégration (plasmide navette)

Le **plasmide Ti** qui contient la région vir est maintenu dans *Agrobacterium tumefaciens*. Un **plasmide intermédiaire** de *E.coli* est utilisé pour faciliter le transfert du transgène. Les **séquences bordures** (24 paires de bases), indispensables, sont placées sur le plasmide intermédiaire afin d'encadrer les gènes que l'on souhaite transférer aux plantes. Ce même plasmide est porteur du gène d'intérêt (+ gène de sélection végétale + gène de sélection bactérienne). Il est sélectionnable et il comporte une origine de répllication fonctionnelle chez *E.coli* et *Agrobacterium*. Il s'intègre dans le plasmide Ti par **recombinaison homologue** grâce à une région homologue (souvent une séquence du plasmide pBR322 dont beaucoup de plasmides dérivent), qu'ils possèdent tous les deux. Ainsi, les régions vir et l'ADN-T vont se retrouver sur le même plasmide.

L'**agrobactérie recombinante** ainsi obtenue (**plasmide navette**), peut alors être utilisée pour transformer génétiquement des cellules végétales. Les souches de l'agrobactérie recombinante choisie de façon à combiner l'ensemble des **gènes de virulence** en fonction de l'espèce végétale cible. Par définition, le '**plasmide navette**' est un plasmide capable de se répliquer dans deux organismes hôtes différents car il porte deux origines de répllication différentes et peut, par conséquent, être utilisé pour transférer des gènes d'un hôte à autre.

Synonyme: vecteur bifonctionnel. Ici, il contient le gène de sélection pour les bactéries (AmpR, par exemple) et le gène de sélection des plantes recombinées (KanR, par exemple) (Figure 26).

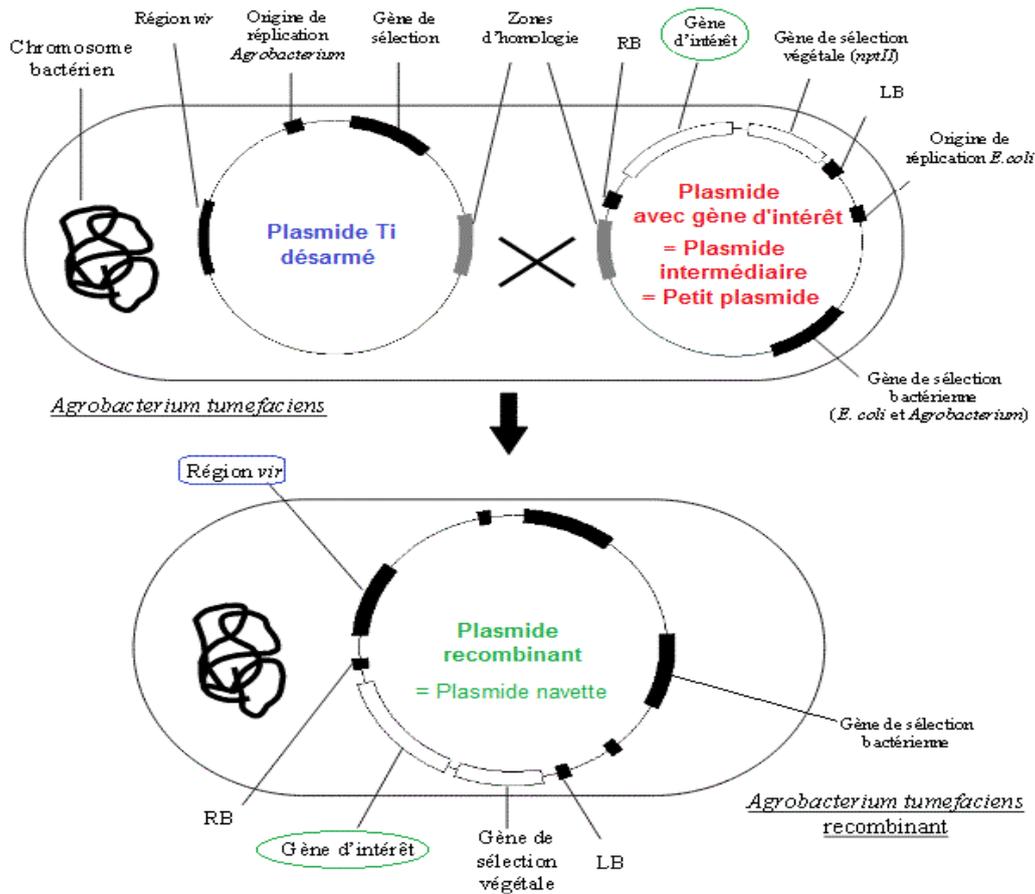


Figure 26 : Transfert par co-intégration (plasmide navette) (Tourte, 2001)

3. Système de transfert binaire par conjugaison triparentale (plasmide binaire)

Naturellement les gènes *vir* et l'ADN-T sont sur le même plasmide. Cependant, leur action est aussi possible *en trans*, effet résultant de deux plasmides différents. Le plasmide de virulence est maintenu dans *Agrobacterium tumefaciens*.

Le plasmide binaire contenant l'ADN-T et préalablement construit dans *E. Coli*, est introduit dans *Agrobacterium tumefaciens* par électroporation ou par conjugaison bactérienne.

La présence des gènes *vir* va permettre le transfert de l'ADN-T (gène de résistance et gène de sélection) dans les cellules végétales.

Un troisième plasmide dit '**plasmide helper**' qui ne peut pas se répliquer chez *Agrobacterium* est également utilisé pour améliorer le transfert du plasmide binaire d'*E. coli* vers *A. tumefaciens* grâce à ses gènes *tra* (pour **transfer**) et *mob* (pour **mobilization**) codant pour les protéines *tra* et *mob*. C'est une **conjugaison triparentale**.

Le plasmide helper ne possédant pas d'origine de répllication d'*Agrobacterium tumefaciens*, est éliminé au cours des divisions successives (Figure 27).

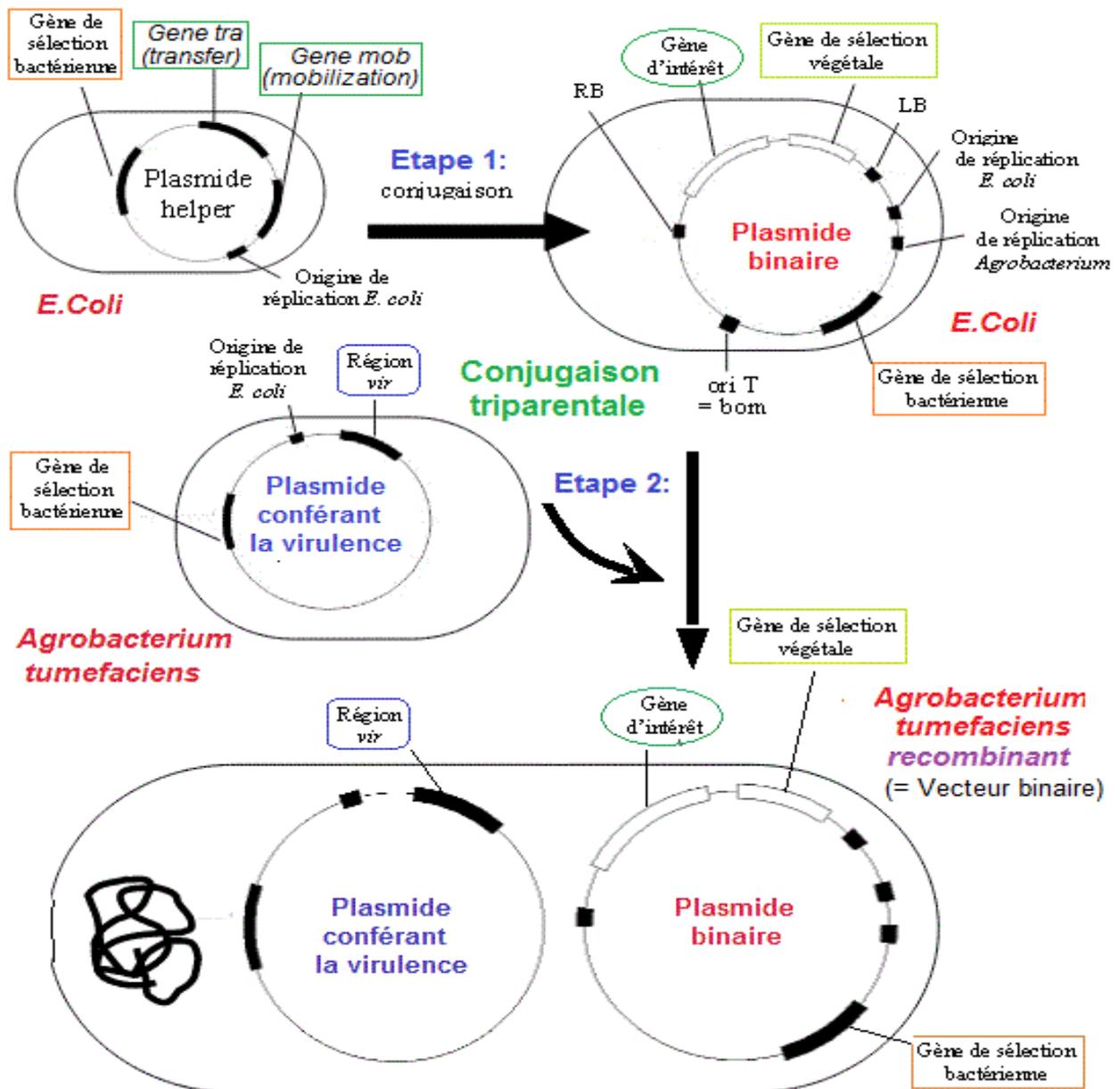


Figure 27 : Transfert binaire par conjugaison triparentale (plasmide binaire) (Tourte, 2001)

La recombinaison permet d'additionner l'ADN des **deux génomes plasmidiques**. Ce nouveau vecteur, appelé **vecteur binaire**, possède la capacité de se répliquer dans *Agrobacterium* et aussi dans *E. coli*. Le plasmide recombiné ainsi obtenu, transforme la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Les bactéries réceptrices sont sélectionnées grâce au gène de sélection bactérien (Amp^R par exemple). Le plasmide Ti désarmé d'*Agrobacterium tumefaciens* induira grâce à son gène de virulence, le transfert de l'ADN-T recombiné dans l'autre plasmide (petit plasmide). Pour rappel, les gènes de virulence sont naturellement induits par des substances diffusées dans le sol par des cellules végétales blessées (phénols, type acetosynringone), qui stimulent un activateur de transcription à deux constituants (Vir A+Vir G) spécifique pour l'ensemble des gènes de virulence.

La bactérie *Agrobacterium tumefaciens* infecte une culture de cellules végétales susceptibles de donner une plante entière, mise à pousser sur un milieu additionné de kanamycine (gène de sélection de la plante KanR). Les clones cellulaires qui poussent ont reçu l'ADN T du **plasmide recombiné** qui s'est intégré dans leur génome. Sur un milieu toujours additionné de kanamycine on laisse les cals régénérer des plantes complètes. La kanamycine interfère avec la fonction plastidique et les plantes non résistantes sont blanches tandis que les plantes résistantes sont vertes.

- **Comment se déroule l'expérience de la conjugaison triparentale?**

Pour réaliser la conjugaison triparentale, les bactéries sont d'abord mises en culture en milieu liquide :

- 1 colonie d'*E.coli* MC1061 contenant le plasmide portant l'ADN-T dans 2 ml de milieu LB additionnés des antibiotiques correspondants.
- 1 colonie d'*E.coli* HB101 contenant le plasmide pRK2013 dans 2 ml de milieu LB additionnés de 25 µg/ml de kanamycine.
- 1 colonie d'*Agrobacterium tumefaciens* pGV2260 (*Agrobacterium* désarmé) dans 2 ml de milieu YEB additionnés de 100 µg/ml d'ampicilline et de 100 µg/ml de rifampicine.

Ces souches d'*Escherichia coli* et d'*Agrobacterium tumefaciens* sont mises en culture sous agitation pendant une nuit, à 37°C et 26 °C respectivement.

Des volumes de 100 µl de chacune des 3 cultures sont prélevés et mélangés dans un microtube stérile. L'ensemble est étalé stérilement à l'aide d'un rateau sur un milieu YEB Mg2+. Après une nuit de culture à 26°C, la conjugaison triparentale est réalisée.

Chapitre IV: Méthodes directes de transfert de gènes chez les plantes

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 limitent le champ d'application de cette technique.
- L'obligation de passer par la culture de tissus et la régénération de plantes *in vitro* représente une contrainte importante dans les groupes d'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 leur génome des fragments de cet ADN étranger.

La stratégie classique consiste à cloner le gène à transférer dans un vecteur de clonage qui possède une origine de répllication fonctionnelle chez *E.coli* et qui permet donc la production rapide de grandes quantités de plasmide.

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.

1. 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 (Figure 28).

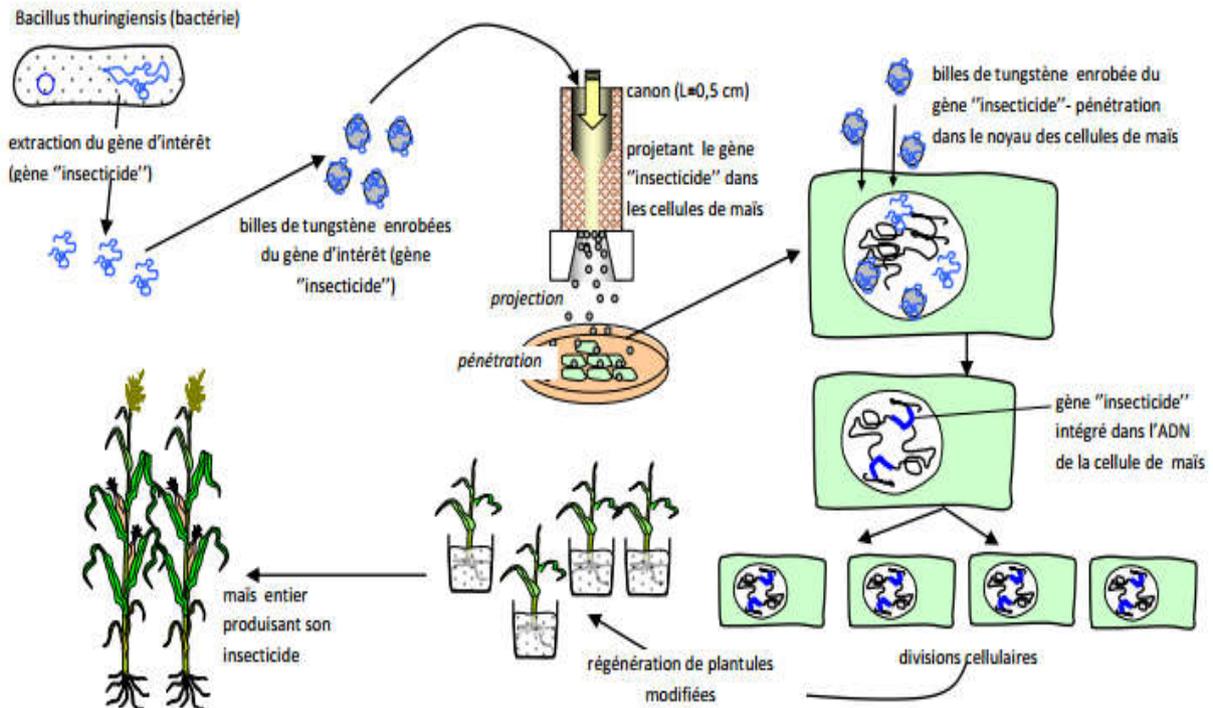


Figure 28 : Création de Maïs OGM Bt résistant à la pyrale par la technique du canon a ADN

2. Transfert sur protoplastes

Les protoplastes sont un matériel privilégié pour le transfert direct de gènes. Débarassées 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 (Figure 29).

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

➤ Action du PolyÉthylène Glycol (PEG)

Le PolyÉthylèneGlycol 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.

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

➤ Electroporation

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.



Figure 29: Transfere directe par la biolistique et sur protoplastes

Chapitre IIV : Applications agronomiques et industrielles

Les biotechnologies interviennent dans plusieurs domaines : santé, agriculture, énergie, agroalimentaire, et protection de l'environnement. Nous traiterons uniquement les deux domaines agronomique et industrielle en fonction de l'importance occupée par chacun.

1. Agriculture

Bien qu'elles ne soient pas encore à un stade avancé, les méthodes modernes des biotechnologies constitueraient un véritable propulseur pour une agriculture futuriste très développée. Les deux principaux axes de l'application des biotechnologies concernent la sélection et la multiplication des plantes ainsi que la création de nouvelles races de plantes.

1.1. Sélection et la multiplication des plantes

En utilisant les méthodes classiques de sélection, il faut attendre de cinq à quinze ans pour qu'une nouvelle espèce de plante soit mise sur le marché ; durée plus importante encore quand il s'agit de plantes ligneuses ; les arbres entre autres. Ce facteur temps est une véritable entrave pour le travail du sélectionneur dont la préoccupation est de raccourcir la durée de sélection et de diminuer le temps nécessaire pour qu'une nouvelle espèce, appelée pour l'occasion génotype, se multiplie. Sur le plan pratique, les techniques dites de multiplication végétatives *in vitro* sont appliquées notamment aux pommes de terre et aux orchidées, mais elles sont finalement généralisées à de nombreuses autres espèces qui présentent des intérêts agricoles. En définitive, ces nouvelles méthodes permettent d'accroître de manière considérable le taux de multiplication par unité de temps et donc de diminuer les coûts de production.

1.2. Création de nouvelles variétés de plantes

La création de nouvelles variétés de plantes vise trois objectifs principaux :

- ❖ Obtention de plantes résistantes aux parasites ;
 - ❖ Obtention de plantes résistantes aux conditions de leur environnement ;
 - ❖ Amélioration des qualités technologique.
- **Création de plantes résistantes aux parasites**

L'avancée majeure dans ce domaine est que les plantes pourraient résister par elles-mêmes aux attaques des parasites, ce qui diminuerait considérablement des recours aux

traitements chimiques. Le but fixé est de permettre aux plantes d'exprimer des gènes qui se développent simultanément avec le développement d'un agent pathogène, ce qui permettra sa suppression systématique. Par ailleurs, on trouve plusieurs techniques permettant aux plantes de mettre au point leurs propres défenses. Ainsi, l'introduction dans une plante de gène codant pour la capsid¹ d'un virus, inhibe pratiquement la multiplication virale. Une autre stratégie a été élaborée à partir de la découverte que certains ARN possèdent des propriétés catalytiques et que l'on utilise contre des cibles bien spécifiques. Ceci permettrait de détruire n'importe quel virus pathogène dès son entrée dans la cellule. D'autres procédés sont aussi utilisés contre différents insectes prédateurs. On utilise par exemple la fameuse bactérie *Bacillus thuringiensis* qui produit des protéines toxiques contre certaines larves et insectes adultes.

- **Création de nouvelles plantes résistantes aux conditions de leur environnement**

Les techniques modernes des biotechnologies permettent, de mettre au point des plantes résistantes aux climats chauds ou froids, à la sécheresse, à la salinité des eaux d'irrigation ou des climats maritimes ; ce qui pourrait intéresser à haut niveau les pays à climat chaud et secs comme la majorité des pays en développement. De même, ces techniques offrent la possibilité de créer des plantes résistantes aux herbicides, plantes qui intéresserait cette fois les fabricants d'herbicides qui espèrent pouvoir développer la vente de leurs produits. Le développement de ces plantes permettrait notamment de faciliter les programmes de désherbage et la culture sur des sols imprégnés de rémanences d'herbicides.

- **Amélioration des qualités technologiques**

L'amélioration des qualités technologiques consiste en une adéquation qualitative de la production des plantes à la demande. En effet, elle doit être une priorité pour l'agriculture dès lors que les caractéristiques des aliments obtenus en fin de la chaîne agroalimentaire sont déterminées dans une large mesure par les propriétés des matières utilisées. Sur le plan technique, ces biotechnologies permettent de modifier les qualités physico-chimiques des produits de deux manières différentes :

- Soit directement et ce par la modification de la composition des protéines qui contribuent à la détermination de la texture des produits finis, à leur valeur alimentaire et au développement d'activités enzymatiques.
- Soit indirectement en insérant ou en extrayant des gènes impliqués dans les voies métaboliques de synthèse des constituants non protéiques de la plante : lipides,

glucides, vitamines, etc. L'objectif étant d'accroître la teneur en certains constituants et d'abaisser la teneur en d'autres. L'exemple le mieux cité est celui de la production de la laine des moutons qu'on a cherché à stimuler en faisant exprimer le gène de la protéine responsable de la production du souffre, principal composant de la laine, dans les plantes tels que la luzerne et le trèfle.

2. Industrie agroalimentaire

S'il est un domaine où les biotechnologies pourraient parfaitement être adapté, ce serait celui de l'industrie agroalimentaire. En effet, et compte tenu de l'objet de cette dernière, à savoir la transformation par un processus biologique des produits agricoles bruts en des produits finaux destinés à la consommation humaine, la place des biotechnologies est très importante. La communauté scientifique pense que ce domaine est celui qui drainera la part la plus importante des innovations technologiques. Au plan pratique donc, l'intérêt des biotechnologies est visible à tous les stades de cette industrie :

- ❖ Amélioration des procédés de transformation ;
- ❖ Amélioration de la matière première agricole ;
- ❖ Amélioration du produit final.

○ Amélioration des procédés de transformation

Il y existe deux applications majeures : L'émergence de nouveaux procédés et le développement de nouvelles méthodes d'analyse

i) Emergence de nouveaux procédés

Parmi les nouveaux procédés utilisés dans la transformation des produits agricoles, on peut citer le génie enzymatique et l'introduction par génie génétique d'enzymes définies dans les ferments utilisés industriellement. La brasserie, la panification¹, les produits laitiers frais et les fromages sont les domaines concernés par ces méthodes.

ii) Le développement de nouvelles méthodes d'analyse

L'agroalimentaire est le domaine par excellence où la compétitivité est déterminée par le couple qualité/salubrité. Dans le processus de transformation des produits agricoles et alimentaires, les entreprises ne connaissent pas avec exactitude la nature chimique des composés très complexes qu'elles mettent en œuvre mais qui déterminent cependant la qualité organoleptique du produit final. Il a été mis au point des ensembles de diagnostic pour détecter d'éventuelles contaminations des aliments. L'introduction des méthodes

enzymatiques de dosage a permis une détermination des éléments essentiels avec une spécificité très importante. De surcroît, d'autres méthodes d'analyse comme la biophysique des molécules, la spectroscopie par infrarouge, la chromatographie se développent aussi au stade industriel. Sans devoir les énumérer, il existe plusieurs autres méthodes d'analyse qui permettent de détecter des molécules ou des organismes présents en faibles quantité.

- **Amélioration du produit final**

Les biotechnologies pourraient entraîner soit l'amélioration des produits existants, soit la création de nouveaux produits. La filière lait est particulièrement illustrative, notamment en raison de la composition même du lait qui contient plus de mille molécules différentes. Grâce aux procédés d'ultrafiltration² et de microfiltration³ ainsi qu'à des nouveaux ferments lactiques, il est désormais possible d'isoler des protéines. Constitutives très spécifiques qui présentent des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles exceptionnelles. Il s'agirait en fin de compte de la création de nouveaux produits dépourvus de leurs constituants nocifs (du beurre sans cholestérol) ou renforcés en d'autres bénéfiques pour la santé (du yaourt type bifidus). Un autre exemple ayant fait du chemin est celui de l'industrie du vin et de la bière. Grâce aux biotechnologies, il est désormais possible d'obtenir des arômes nouveaux ou des bières sans alcools en stoppant la fermentation alcoolique par des levures recombinées génétiquement. Toujours, dans ce sens, on a réussi à produire un type de colza produisant une huile dépourvue de substances cancérigènes. En définitive, les biotechnologies ouvrent la voie à la mise sur le marché de gammes différenciées de produits adaptées à toutes les catégories de consommateurs : personnes âgées, sportifs, enfants, femmes enceintes, etc.

Chapitre IIIV : Plante transgéniques et leurs impacts sur la santé et l'environnement

1. Les OGM et leurs bénéfices

1.1. Santé

*Alimentation

Les OGM peuvent amener à l'amélioration de la qualité des aliments. En effet, ils peuvent entraîner la modification de la teneur en certains nutriments, comme par exemple la modification de la composition des huiles en acides gras afin de diminuer les risques d'accidents cardio-vasculaires ou d'inhiber l'expression d'un gène responsable de la synthèse d'une protéine provoquant des allergies, par exemple sur le riz.

Les OGM peuvent également aboutir à une meilleure conservation. Celle-ci s'illustre par la tomate «flavr-savr», commercialisée depuis 1994 aux Etats-Unis. Cette tomate est génétiquement modifiée, ce qui lui permet d'exprimer en plus faible quantité l'enzyme qui provoque le ramollissement de la tomate au moment de la maturation. La texture reste ferme longtemps. Ceci facilite le transport et le stockage. On assiste même parfois à un accroissement de la saveur du fruit, qui est alors récolté à un stade de maturation plus avancé (Figure 30).



Figure 30 : Etat d'une tomate contrôle et transgénique

L'amélioration des aliments, quelques exemples :

Blé : Amélioration des caractéristiques requises pour la panification.

Pomme de terre : Augmentation de la teneur en amidon pour des utilisations industrielles.

Laitue, épinard : Réduction de la teneur en nitrates en augmentant l'expression de nitrate-réductase.

Tomate, melon, brocoli : Augmentation de la durée de conservation des fruits et légumes.

Riz : Diminution des propriétés allergisantes

Soja : Enrichissement en acide aminé essentiel (méthionine).

***Médecine**

Les plantes ont depuis toujours été utilisées à des fins médicales. Le génie génétique permet la production de molécules pharmaceutiques par les plantes. La transgénèse permet en effet de transformer les plantes en véritables «usines à médicaments ». Le gène est modifié de telle sorte qu'il conduise à l'obtention de protéines à usage thérapeutique, cette technique peut alors être utilisée à la place de synthèses chimiques ou d'extraction de substances issues d'organes humains ou animaux. En effet, les bactéries, les levures ou encore les cellules animales sont largement utilisées pour la production de protéines recombinantes à usage thérapeutique mais ces techniques ne sont pas assez productives et assez coûteuses, le coût étant du au contrôle des virus pathogènes.

Les plantes transgéniques sont donc un mode de production de molécules moins coûteux et plus sûr que les cellules de mammifères en culture ou que les souches bactériennes.

On peut citer différentes caractéristiques et différents avantages des systèmes de production de protéines à intérêts pharmaceutiques par les plantes :

- ✓ Les cellules végétales sont des cellules eucaryotes, comme les cellules humaines, il y a donc une production de protéines complexes ayant des propriétés thérapeutiques, comme les protéines humaines. La transgénèse permettrait également l'obtention de vaccins impossibles à concevoir par les méthodes traditionnelles.
- ✓ Le niveau des biotechnologies végétales actuel permet de cibler de façon spécifique les tissus dans lesquels s'exprimera la protéine d'intérêt.
- ✓ Dans l'état actuel des connaissances, il n'existe pas de pathogène végétal capable d'infecter l'animal et l'Homme. Le risque d'infection ou de contamination par les protéines produites par les plantes est quasiment néant, au contraire des protéines produites par des cellules de mammifères ou d'animaux transgéniques.

1.2. Environnement

Les variétés transgéniques permettraient de moins recourir à des insecticides ou à des herbicides.

• Herbicides au profil écotoxicologique favorable

La production de plantes tolérantes aux herbicides permet l'utilisation de matières actives au profil favorable (faible durée de vie, biodégradabilité rapide, respectant l'environnement, large efficacité). Les cultures peuvent supporter ce traitement grâce à

l'introduction d'un gène de tolérance spécifique. En 1996, un nouveau système de désherbage est lancé en Amérique du Nord sur le soja, le colza ou encore le maïs.

- **Réduction de l'utilisation des insecticides**

En 1999, en Chine, les agriculteurs cultivant du coton Bt (résistant aux insectes) ont utilisé en moyenne 10 kg/ha d'insecticides alors que ceux qui ont cultivé des variétés non-transgéniques en ont utilisé près de 58 kg/ha, soit pratiquement 6 fois plus.

- **Enrichissement du patrimoine végétal**

La sélection classique possède la capacité d'enrichir les espèces et les variétés mais les biotechnologies ont des outils qui ouvrent davantage le champ des possibilités ce qui entraîne une extension du patrimoine végétal.

Les stress environnementaux (ou abiotiques) comme la sécheresse, la salinité et les basses températures sont des conditions de stress qui affectent la croissance et le rendement des plantes. Les biotechnologies pourraient permettre d'améliorer ceux-ci en intégrant aux plantes cultivées des gènes impliqués dans la réponse des gènes au stress. Les nouvelles variétés n'en sont encore qu'au stade expérimental. Il reste encore à s'assurer si ces tolérances sont conservées au champ. Plusieurs années d'évaluation sont encore nécessaires.

De plus, les OGM permettraient une augmentation de production considérable, entraînant des avantages économiques pour les producteurs.

2. Risques potentiels liés aux OGM

2.1. Santé

Les gènes de sélection, introduits dans la plante en même temps que le gène d'intérêt, sont en général des gènes de résistance à un antibiotique d'origine bactérienne. Ils pourraient être transmis des OGM végétaux aux microorganismes proches de la flore intestinale de l'homme ou de la flore du sol. De tels flux de gènes sont connus entre microorganismes (par conjugaison bactérienne) et des bactéries pathogènes pour l'homme pourraient ainsi acquérir une résistance à un antibiotique qu'elles ne possédaient pas naturellement. Les antibiotiques utilisés en médecine seraient alors moins efficaces, voire même impuissants à combattre un nouveau microorganisme très virulent.

Un autre problème est lié à l'introduction aléatoire du transgène dans le génome de la plante. Il peut, en s'insérant dans certaines séquences d'ADN, provoquer des mutations et

conduire à la perturbation du métabolisme de l'OGM, voire même à la production de molécules nouvelles, qui seraient dangereuses pour le consommateur.

2.2. L'environnement

Les OGM construits pour résister à un agent pathogène exercent une pression de sélection sur la population-cible de ravageurs. Des individus résistants peuvent apparaître par mutations ponctuelles. Ils peuvent se reproduire, transmettre à leur descendance l'allèle de résistance apparu. L'agriculteur, qui cherche à maintenir le rendement de sa culture, va utiliser davantage de produits phytosanitaires pour éliminer les individus ravageurs résistants, et donc, en définitive, l'effet inverse de celui escompté : la pollution des sols.

3. Avantages et inconvénients des OGM

Les OGM représentent une technologie de manipulation du vivant, lourde et coûteuse mais qui autorise des modifications phénotypiques potentiellement intéressantes. Les applications dans le domaine de la recherche, de l'alimentation, de la santé ou de l'industrie sont multiples. Cependant, la méconnaissance des risques potentiels et des conséquences éventuelles à long terme sur la santé humaine et sur l'environnement laisse la voie ouverte à toutes les polémiques, scientifiques, économiques, politiques et même éthiques.

Aux individus devenus résistants de trouver des partenaires sexuels sauvages en nombre et leur croisement autorise la dilution de l'allèle de résistance.

Un autre risque pour l'environnement est la dissémination des pollens transgéniques (« flux de gènes ») vers les populations de mauvaises herbes environnantes, d'espèces proches de celle de l'OGM cultivé. Des croisements interspécifiques pourraient conduire à transformer des plantes voisines.

C'est la biodiversité végétale elle-même qui se trouve menacée. De plus, les mauvaises herbes risquent d'intégrer un gène censé procurer un avantage à l'OGM. Si celui-ci est une résistance aux herbicides, les mauvaises herbes deviendraient résistantes et les doses d'herbicide employées pour les éliminer seraient décuplées, menaçant de pollution l'environnement (tableau II).

Tableau II: Quelques exemples des plantes OGM ; caractéristique apportée, avantages, risques et statut.

Plante OGM	Caractéristique apportée par le(s) transgène(s)	Avantages	Risques/problèmes	Statut
Maïs « BT »	Production d'une protéine insecticide d'origine bactérienne contre la pyrale (insecte ravageur)	Réduction des coûts d'usage d'insecticides chimiques	<ul style="list-style-type: none"> • Mortalité accrue des insectes pollinisateurs et auxiliaires • Sélection d'insectes résistants à la protéine insecticide 	Commercialisé aux États-Unis depuis 1995
Colza « Round-up ready »	Tolérance à une forte quantité d'herbicide	Permet de désherber les champs après la germination du colza	<ul style="list-style-type: none"> • Transfert des gènes de résistance à l'herbicide à d'autres plantes • Utilisation accrue d'herbicide 	Commercialisé aux États-Unis depuis 1997
Tomate « Mac Gregor »	Augmentation de la durée de conservation de plusieurs semaines	Facilite le transport et la commercialisation	L'absence de pourrissement rend difficile la perception de la fraîcheur du fruit	Commercialisé aux États-Unis depuis 1994
Riz doré	Augmentation de la teneur en vitamine A	Réduction des carences en vitamine A (qui touchent 200 millions de personnes)	L'obtention d'un effet implique de consommer 9 kg de riz cuit par jour	En développement

4. Les deux types d'OGM les plus fréquents

4.1. OGM tolérant à un herbicide

Le soja tolérant à un herbicide total et la plante transgénique la plus courante. Cette propriété est obtenue grâce à l'insertion d'un gène microbien dans les cellules de la plante. (Figure 31). On peut ainsi arroser les cultures de pesticides sans crainte que cela ne tue à la fois les « nuisibles » et les cultures.

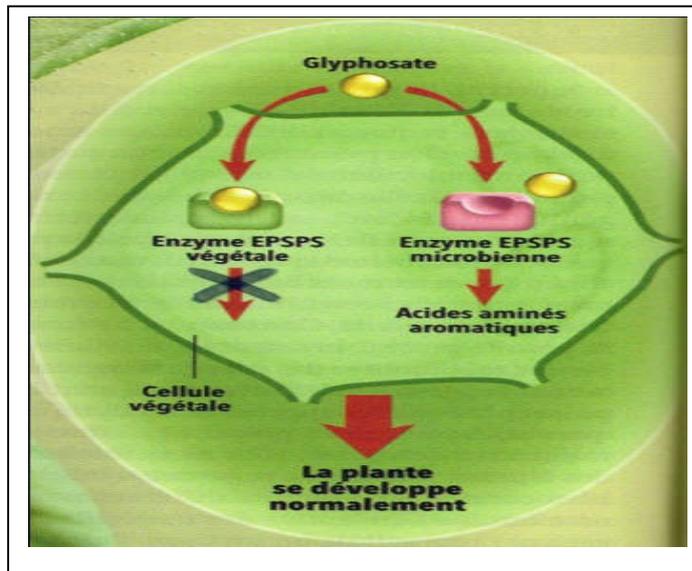


Figure 31 : Action de l'enzyme EPSPS microbienne dans la cellule de la plante

4.2. OGM produisant un insecticide

Le maïs dit « Bt » est représentatif de la seconde catégorie la plus courante de plantes transgéniques : celles qui produisent une toxine insecticide en continu. Cette propriété est obtenue par l'insertion d'un gène de la bactérie *Bacillus thuringiensis*, d'où le nom de maïs « Bt » dans les cellules embryonnaires de la plante (Figure 32). Ce gène code une toxine insecticide nommée Cry (en bleu).

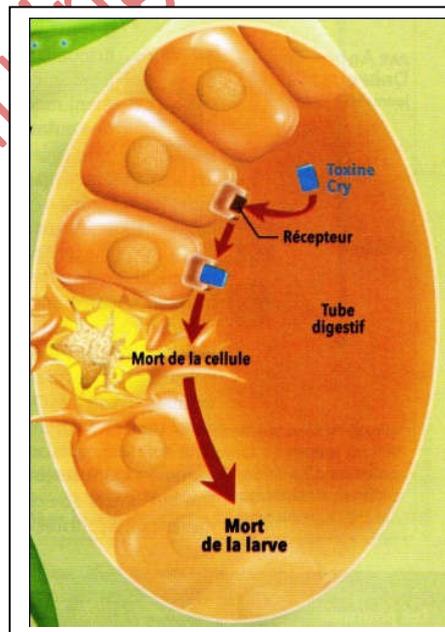


Figure 32 : Action de la toxine Cry dans les cellules intestinales d'un insecte