

## **Chapitre II : Biotechnologie végétale**

### **1. Arabidopsis thaliana comme plante modèle**

*Arabidopsis thaliana*, petite mauvaise herbe de la famille des crucifères (brassicacées) est la première plante choisie comme organisme expérimental modèle pour étudier la génétique moléculaire des plantes. Elle possède plusieurs caractéristiques qui conviennent particulièrement à l'étude de la génétique classique et moléculaire par différents caractères :

- Sa courte durée de végétation. Il ne faut que six semaines pour passer de la graine à la graine, et chaque plante peut produire plus de 10 000 graines.
- Sa petite taille. *Arabidopsis* est une plante tellement petite qu'on peut cultiver des dizaines d'individus dans un petit pot ; sa croissance rapide ne demande que de la terre humide et une lumière fluorescente.
- Son adaptabilité. Les plantes d'*Arabidopsis* se développent bien sur des milieux stériles, définis biochimiquement. De plus, il a cultivé des cellules d'*Arabidopsis* et régénéré des plantes à partir de ces cellules.
- Elle est normalement autogame. Cette propriété permet d'obtenir de nouvelles mutations à l'état homozygote avec un minimum d'effort.
- Sa susceptibilité à l'infection par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, qui transporte des plasmides capables de se recombiner à des gènes étrangers.
- Son génome relativement petit (125 millions de paires de bases, correspondant à quelque 26 000 gènes), ce qui simplifie le travail d'identification et d'isolement des gènes.

Aucune plante cultivée ne possède tous ces caractères d'*Arabidopsis*. Les plantes cultivées usuelles ont une durée de végétation de plusieurs mois et demandent beaucoup d'espace quand on les cultive en grand nombre. De plus, celles qui ont été utilisées pour des travaux sur l'ADN recombinant possèdent des génomes de grande taille et des quantités importantes d'ADN répétitif.

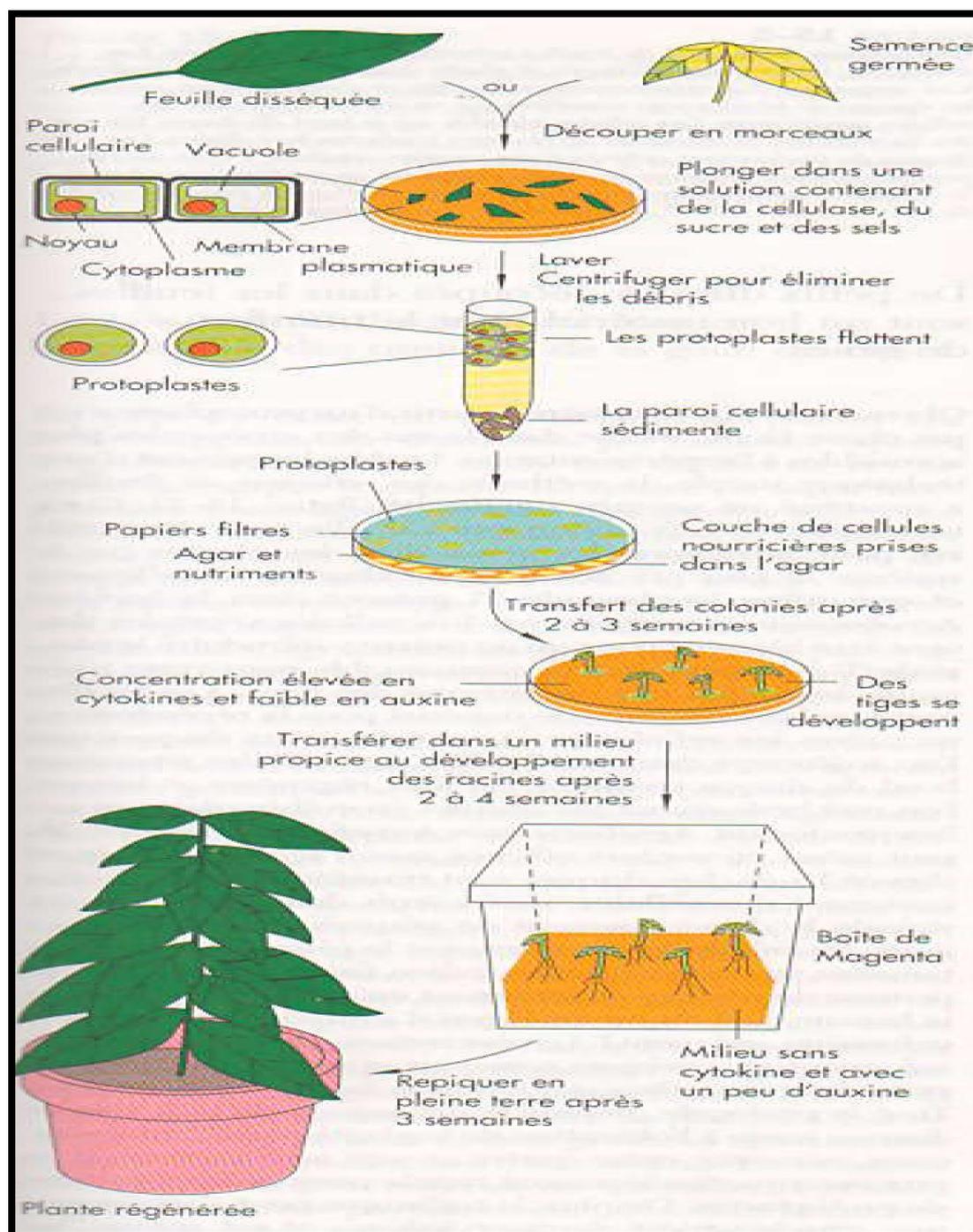
## 2. Méthodes de génération d'une plante entière

### 2.1. Génération d'une plante à partir de protoplastes

Une plante entière peut se régénérer à partir d'une seule cellule, lorsqu'une plante est blessée un secteur de cellules non différenciées appelé cal se développe sur le site de la blessure. Si on prélève un morceau d'un cal récent et qu'on l'introduit dans un milieu de culture contenant les éléments nutritifs et les hormones de croissance végétales appropriées, les cellules continuent de se développer et de se diviser pour former un agrégat de cellules. Ces cellules peuvent être étalées et se développer dans une culture de cellules nourricières pour former de nouveaux cals. Les cals se redifférencient ensuite en pousses et racines et finalement une plante entière est produite.

La différenciation des cellules d'un cal dépendait des concentrations relatives des hormones végétales, auxines et cytokines dans le milieu. Si le rapport auxine/cytokines est élevé, il se développe des racines alors que dans le cas contraire, on obtient des pousses.

Il n'est pas facile d'introduire de l'ADN dans ces cellules car comme toutes les cellules végétales, elles sont entourées d'une paroi cellulosique. Néanmoins, on peut se débarrasser de cette paroi en traitant les cellules avec des enzymes, des cellulases de champignons. Le protoplaste que l'on obtient n'est plus entouré que d'une membrane plasmique, ce qui le rend beaucoup plus accessible aux manipulations expérimentales. Les protoplastes peuvent incorporer des macromolécules comme l'ADN et il est possible de régénérer des plantes entières à partir de protoplastes, grâce à la formation de cals (**Figure 1**).



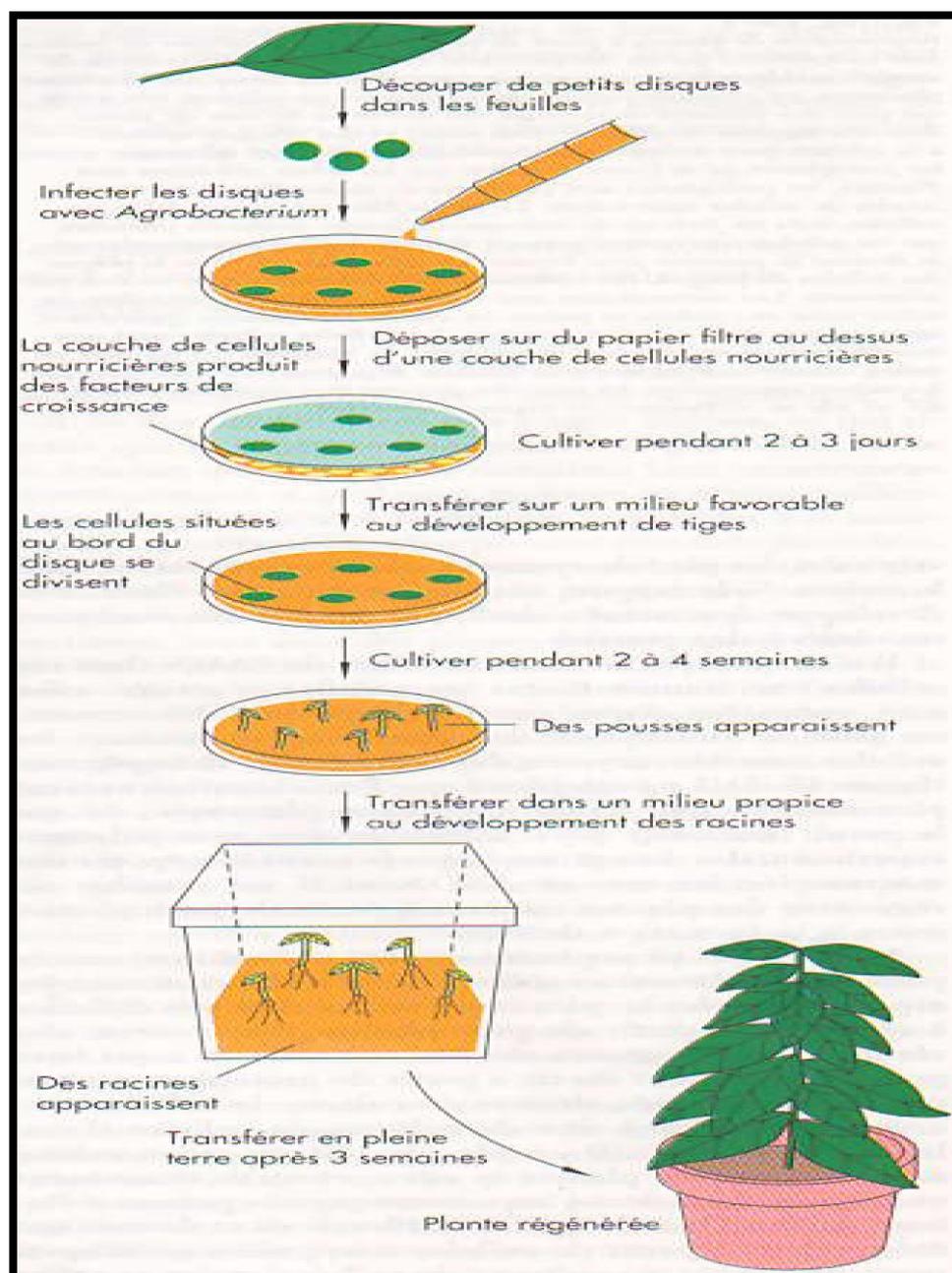
**Figure 1**

## 2.2. Génération d'une plante à partir de disques de feuilles

Obtenir une plante entière à partir d'un protoplaste n'est pas chose facile, même dans le cas des espèces les plus accessibles à l'expérimentation. Le développement d'une technique simple, la méthode des disques de feuilles a constitué un progrès significatif. Cette technique est très importante car elle peut être utilisée pour introduire des gènes

dans des plantes (par exemple en utilisant le plasmide Ti présent dans la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*) (**Figure 2**). Les cellules végétales doivent être blessées pour qu'on puisse introduire le plasmide Ti. On peut utiliser comme cible pour cette technique aussi bien des racines que des tiges. Les feuilles sont une bonne source de matériel pour la génération ; on utilise les cellules provenant de petits disques que l'on a découpé dans ces feuilles. Les cellules situées au bord du disque commencent à se régénérer et lorsque on met brièvement ces disques en culture dans un milieu contenant *Agrobacterium tumefaciens*. Les disques sont transférés sur des boîtes contenant des cellules nourricières dans un milieu qui stimule le développement des pousses. Après quelques jours les cellules qui contiennent le plasmide sont sélectionnées par culture sur un milieu favorisant le développement de pousses et contenant un antibiotique. Les pousses se développent en quelques semaines et on les transfère ensuite dans un milieu qui induit la formation de racines.

Tout le protocole depuis le découpage de la feuille en disques jusqu'à l'obtention de la plante possédant des racines, nécessite entre 4 et 7 semaines. C'est un processus particulièrement rapide comparé aux cultures de protoplastes.



**Figure 2**

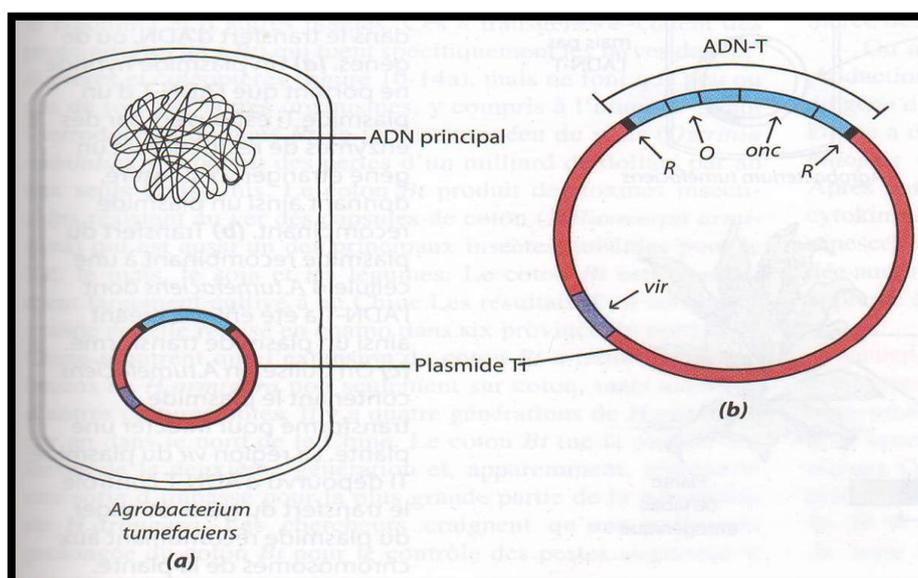
### 3. Méthodes de transfert d'un gène

#### 3.1. Transfert indirect par *Agrobacterium tumefaciens*

Il s'agit d'un processus naturel réalisé par une bactérie (*Agrobacterium tumefaciens*) qui entraîne la galle du collet. Cette bactérie a la propriété remarquable de transférer une partie de son ADN dit ADN-T dans le génome des cellules végétales

pour les asservir à ses besoins en leur faisant produire des opines, substrat aminocarboné que seule la bactérie peut cataboliser (**Figure 3**).

Le transfert, qui se fait par un plasmide de 200 kb environ, demande des fonctions de virulence et de la reconnaissance de certaines séquences d'ADN. La séquence transférée est limitée et définie par deux séquences (de 25 paires de bases), appelées bordure gauche (BG) et bordure droite (BD), reconnues par les protéines de virulence (Vir). Protégé et entraîné par des protéines Vir, ce brin est conduit jusque dans le noyau des cellules infectées. Une protéine Vir accrochée à l'une des extrémités de l'ADN-T provoque la cassure de l'ADN hôte quand une zone de quelques bases homologues de l'extrémité de l'ADN-T est reconnue. Il y a alors déplacement des brins d'ADN et insertion de l'ADN-T, avec l'aide d'enzymes de réparation et de l'ADN de la cellule hôte.



**Figure 3**

N'importe quelle séquence d'ADN peut être placée entre les bordures droite et gauche, elle sera intégrée dans le génome de la plante, comme l'aurait été la séquence d'ADN-T. Pour le transfert, on utilise des plasmides désarmés, ayant perdu leur pouvoir pathogène par suppression des gènes responsables de la formation de la tumeur, mais avec les fonctions de virulence, essentielles pour l'introduction dans la cellule et le transfert de la séquence d'ADN jusqu'au noyau.

La méthode la plus utilisée est celle du système binaire. On place chez *Agrobacterium* deux plasmides qui restent indépendants et seront injectés tous les deux dans la cellule

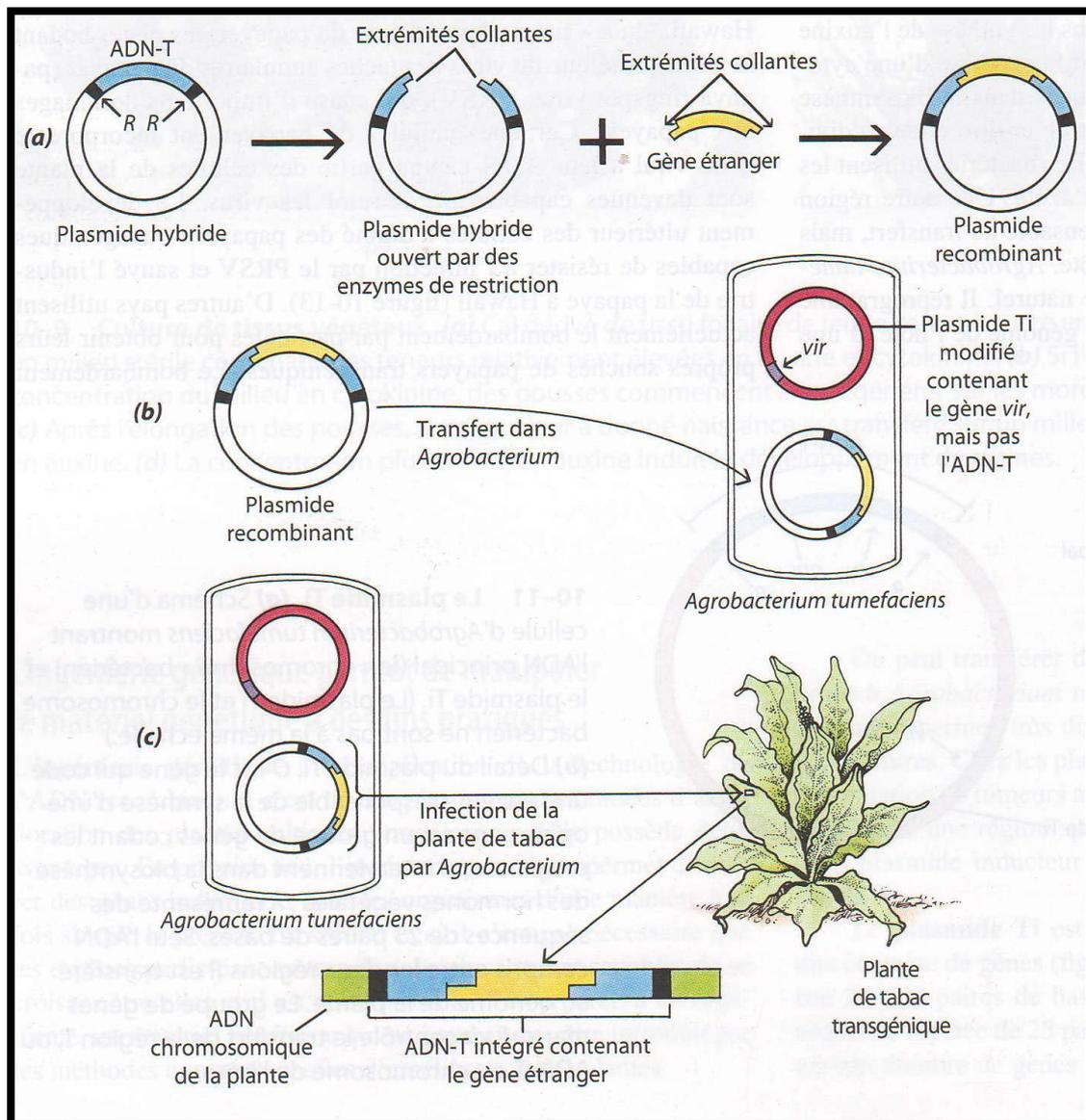
: un plasmide dit « assistant » qui porte les gènes de virulence et l'origine de réplication du plasmide Ti et un plasmide de petite taille ( $5 \cdot 10^3$  paires de base) préparé dans *Escherichia coli* portant la construction gène d'intérêt + marqueur de sélection entre les bordures droite et gauche, avec une origine de réplication fonctionnelle dans *Agrobacterium* (compatible avec le plasmide Ti). Ce plasmide dit « binaire », par référence à la méthode utilisée, est donc capable de se répliquer à la fois dans *Escherichia coli* et dans *Agrobacterium*. Le plasmide assistant est destiné à promouvoir le transfert du plasmide portant le transgène (de la reconnaissance de la cellule jusqu'à l'intégration du transgène dans le génome). Par cette méthode, seuls le transgène et le marqueur de sélection sont intégrés (**Figure 4**).

Il est aussi possible de construire un plasmide binaire avec deux régions d'ADN-T, une région pour le gène d'intérêt et une région pour le marqueur de sélection, le marqueur de clonage étant en dehors de ces régions. Les deux gènes sont alors réintroduits de façon indépendante dans le génome.

Ces constructions facilitent l'élimination du gène marqueur ; elles sont à privilégier pour une transgénèse ne transmettant que le gène désiré.

Au début des travaux de recherches sur la transgénèse, le transfert par *Agrobacterium* n'était efficace que pour les dicotylédones en effet la technique est maîtrisée chez le riz et le maïs. Les graminées semblaient exclues de cette voie car elles étaient insensibles à l'infection par *Agrobacterium*.

Le transfert par *Agrobacterium* présente l'avantage de n'introduire qu'un nombre limité de copies du gène (une à deux ou trois) dans le génome d'une cellule transformée.

**Figure 4**

### 3.2. Transfert direct

**3.2.1. L'électroporation** : est un procédé physique qui consiste à soumettre les protoplastes à de courts chocs électriques de fort voltage. Ces derniers ont pour effet de conduire à l'ouverture de pores qui facilitent le passage d'ADN exogène à travers la membrane plasmique.

Un des intérêts des protoplastes est de permettre le transfert de grandes quantités d'ADN, voire d'organites entiers dans la cellule isolée.

La limitation principale de la transformation de protoplastes est la nécessité de disposer de protocoles de régénération à partir de quelques cellules pour chacun des

génotypes qu'on cherche à modifier. Les longues phases de culture *in vitro* de cellules indifférenciées nécessaires pour passer du protoplaste à la plante, engendrent parfois l'apparition de modifications dans la morphologie ou la physiologie des plantes néoformées. Afin de minimiser le temps de culture *in vitro*, la transformation d'agrégats multicellulaires pourvus de parois a également été réalisée par l'électroporation.

Par ailleurs, l'utilisation de cette technique entraîne le risque d'un transfert de plusieurs copies, un phénomène qui peut avoir d'importantes conséquences sur la stabilité de l'insert ou de son expression.

### **3.2.2. La microinjection**

Des gènes peuvent être injectés directement dans des protoplastes, et même dans des noyaux, grâce à une très fine aiguille que l'on manipule dans le champ d'un microscope. Une micropipette exerçant une succion est généralement employée pour maintenir le protoplaste afin qu'il ne soit pas repoussé par l'aiguille.

### **3.2.3. Le canon à particules (biolistique)**

Cette méthode encore dénommée biolistique consiste, littéralement, à propulser le transgène à l'intérieur des cellules végétales qu'elles soient isolées ou qu'elles appartiennent à un tissu ou à un organe. Les constructions moléculaires sont adsorbées à la surface de projectiles microscopiques, des billes de 0,6 à 2 µm de diamètre en tungstène ou en or. Les cellules, tissus ou organes végétaux sont soumis à un bombardement, les billes sont progressivement freinées en traversant les différentes couches cellulaires. Quelques-unes des cellules atteintes vont survivre à la blessure causée par la particule et insérer spontanément les transgènes dans leur génome.

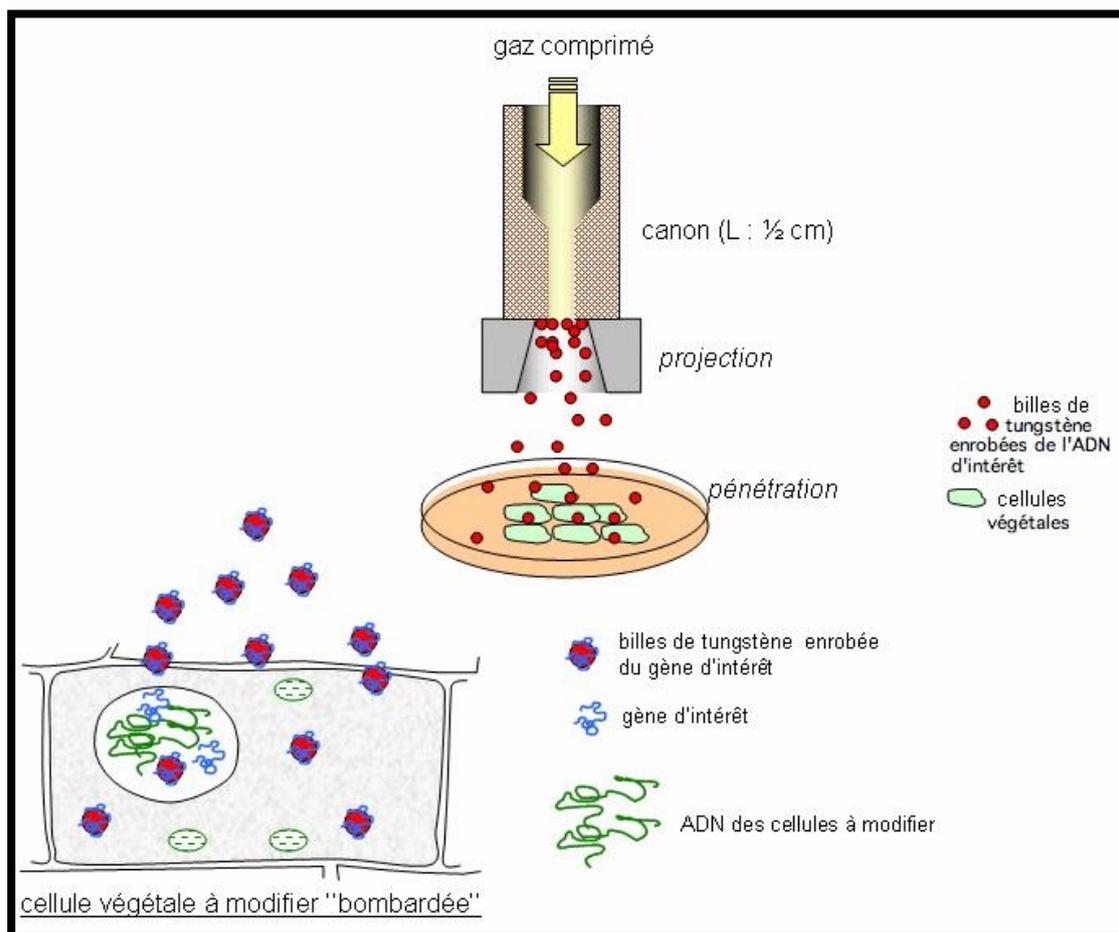
Différentes forces de propulsion peuvent être utilisées : la poudre (premier système à avoir été développé), la force électrique, le gaz (**Figure 5**).

Pour avoir une bonne efficacité de transformation, il faut parvenir à toucher un grand nombre de cellules sans créer trop de destructions cellulaires. Dans ce but, certains paramètres doivent être optimisés selon le type de tissu végétal, la nature des particules (taille, densité...) et leur préparation (solution, teneur en ADN, la distance qu'elles parcourent et le prétraitement des cellules (plasmolyse).

La biolistique permet de transformer un très grand nombre d'espèces végétales dont le riz, le blé, le soja et le maïs. Elle est également utilisée avec succès pour transformer le génome chloroplastique du tabac. Toutefois elle met en œuvre un matériel assez lourd et nécessite une phase de mise au point. Son principal désavantage est dû au fait qu'elle

entraîne fréquemment l'intégration d'un nombre élevé de copies du transgène (parfois plusieurs dizaines).

Par ailleurs, la biolistique a été appliquée à la transformation génétique de gamètes. Disposer d'un pollen transgénique est particulièrement intéressant pour pouvoir réaliser des transformations rapides. En effet, le pollen transgénique est, en théorie, utilisable pour féconder des variétés sexuellement compatibles et obtenir, sans étape de régénération, des plantes transgéniques de la variété voulue.



**Figure 5**

#### 4. L'élimination des gènes marqueurs

Pour limiter tout risque possible dû à la présence du gène (marqueur de sélection) dans le génome, en particulier dans le cas d'un marqueur « résistance aux antibiotiques », ce marqueur peut être éliminé.

La meilleure solution est l'introduction sur des fragments séparés du gène désiré et du marqueur de sélection. Avec le transfert par la méthode *Agrobacterium*, cela se fait par l'utilisation du système binaire ; on utilise une souche d'*Agrobacterium* possédant trois plasmides, le plasmide « assistant » avec les fonctions de virulence et deux vecteurs

binaires, l'un avec le marqueur de sélection entre les deux bordures de l'ADN-T, l'autre avec le gène d'intérêt entre les deux bordures de l'ADN-T; les fonctions de virulence du plasmide assistant permettent alors le transfert des deux types d'ADN-T dans la cellule. Les insertions du gène d'intérêt et du gène marqueur se font de façon indépendante, mais, il apparaît que si l'intégration du marqueur a lieu celle du gène d'intérêt a aussi souvent lieu en même temps. Une variante est issue de cette méthode : elle consiste à utiliser un système binaire comprenant un plasmide assistant désarmé et un plasmide binaire avec deux zones T, l'une contenant le gène d'intérêt, l'autre le marqueur de sélection. Dans ce cas, le gène d'intérêt et le marqueur de sélection sont encore insérés de façon indépendante dans le génome.

Avec le transfert par biolistique, deux fragments sont préparés, l'un avec le gène marqueur, l'autre avec le gène d'intérêt ; là encore, ils s'insèrent de façon indépendante dans le génome.

Après sélection, quelle que soit la méthode de transfert, on obtient donc une plante double hémizygote, pour le gène désiré et pour le marqueur, avec dans leur quasi-totalité des insertions se situant sur des chromosomes différents ou éloignées sur un même chromosome. S'il n'y a qu'un seul gène marqueur et un seul gène d'intérêt,

L'autofécondation d'une telle plante donnera donc en théorie la disjonction propre à deux locus indépendants, soit 9/16 de plantes avec le gène d'intérêt et le marqueur, 3/16 de plantes avec seulement le gène d'intérêt, 3/16 de plantes avec seulement le marqueur et 1/16 de plantes sans le gène d'intérêt ni le marqueur.

Par utilisation de sondes moléculaires des gènes, les plantes avec seulement le gène désiré peuvent alors être sélectionnées et fixées. C'est maintenant la technique la plus répandue.

Ces différentes possibilités d'élimination des gènes marqueurs montrent que la transgénèse est de mieux en mieux maîtrisée. L'objectif est de n'introduire que le gène désiré, en une seule copie, là où l'on veut, pour qu'il s'exprime toujours de la même façon. Lorsqu'il sera complètement atteint, la transgénèse se différenciera donc de moins en moins de ce qui est fait par les méthodes classiques d'amélioration des plantes, et ceci d'autant plus que les gènes viendront de la même espèce.

## 5. Variétés transgéniques pour la qualité nutritionnelle

### 5.1. Qualité des apports glucidiques

La composition des glucides des graines, des tubercules et des racines peut être modifiée par transgénèse à des fins alimentaires. Les fructanes, qui sont des polymères du fructose, font en particulier l'objet de travaux, car ils présentent un grand intérêt pour la nutrition humaine : en effet

- Les fructanes à chaîne courte, avec un faible degré de polymérisation, sont utilisés comme sucre à basse calorie. Ils sont essentiellement produits en fermenteurs avec une enzyme produite par un champignon du genre *Aspergillus*.
- Les polymères à chaîne longue de fructose (par exemple l'inuline extraite de la chicorée, *Cichorium intybus*) présentent l'avantage de n'être pratiquement pas hydrolysés avant de parvenir dans le colon : cela permet d'avoir des aliments glucidiques moins énergétiques et la longueur de la chaîne renforce le rôle de fibre, avec un effet très favorable sur les bifidus de la microflore intestinale.

On peut améliorer la chicorée pour sa teneur en inuline, mais il est aussi possible de faire produire cette substance dans une racine de plante très sélectionnée : la betterave à sucre, qui accumule beaucoup de saccharose dans ses vacuoles ; il suffit de transformer le saccharose en fructane chez la betterave.

La production des fructanes à chaîne courte nécessite l'introduction d'un seul gène codant pour la sucrose sucrose-fructosyl transférase (SST), les fructanes à chaîne longue peuvent être produits par l'introduction de deux gènes ; le gène codant pour la sucrose sucrose-fructosyl transférase (SST) et celui codant pour la fructane fructane-fructosyl transférase (FFT).

Ils ont été transférés avec succès dans une variété de betterave ; ainsi, par la transgénèse, une production économique des différents types de fructanes serait possible, ce qui pourrait contribuer à leur plus large utilisation dans l'alimentation humaine.

### 5.2. Équilibre des acides aminés

Le manque de protéines et le déséquilibre en acides aminés des rations alimentaires est à l'origine de problèmes de malnutrition de populations défavorisées qui ont une alimentation basée sur des céréales, des tubercules ou racines. En effet, les céréales sont souvent pauvres en acides aminés indispensables en particulier en lysine et tryptophane

; quant à la pomme de terre, légume très répandu dans le monde, elle est pauvre à la fois en protéines et en acides aminés indispensables.

Les légumineuses à graines, qui sont des sources importantes de protéines pour l'homme et les animaux sont le plus souvent assez riches en lysine mais pauvres en méthionine et en cystéine. Une alimentation associant céréales et légumineuses peut donc limiter les risques de carence des principaux acides aminés indispensables. Cependant, pour les populations défavorisées, l'augmentation des teneurs en lysine et tryptophane des céréales et en méthionine des légumineuses permettant d'avoir plus facilement une alimentation avec les acides aminés indispensables.

Des voies d'amélioration ont été explorées et différentes pistes ont été ouvertes par la transgénèse. La lysine régule sa propre synthèse par un rétrocontrôle qui inhibe l'activité d'une enzyme intervenant dans sa synthèse, la dihydrodipicolinate synthétase (DHPS).

Deux voies sont alors étudiées pour accroître la teneur en lysine des grains de céréales, - soit augmenter la teneur en lysine libre, - soit augmenter la teneur en protéines riches en lysine. Pour élever la teneur en lysine libre il faut réduire la sensibilité de la DHPS au rétrocontrôle par la lysine.

Des gènes de bactéries (*Corynebacterium*) codant pour une DHPS insensibles à ce rétrocontrôle ont été identifiés. Chez le maïs, le gène DHPS placé sous un promoteur spécifique de l'embryon de la graine, augmenterait de façon très significative la teneur en lysine (de 50 à 100 %) avec un faible catabolisme.

L'autre stratégie consiste à introduire des gènes codant pour les protéines riches en lysine. Des gènes codant pour deux protéines de l'orge (l'hordothionine HT12, et la « Barley high lysine protein 8 », BHL8), contenant respectivement 28 et 24% de lysine) ont aussi été introduits avec un gène bactérien codant pour une DHPS « résistante » au rétrocontrôle de la lysine. Les teneurs en lysine sont passées de 0,2 % à 0,7 %.

Pour la teneur en méthionine, le problème apparaît encore plus complexe. La seule voie montrant des résultats assez positifs est l'introduction de gènes codant pour des protéines riches en méthionine. Une première voie explorée a été l'utilisation du gène de la noix du Brésil (*Bertholletia excelsa*) codant pour l'albumine 2S, riche en méthionine ; introduit chez le soja, il en résultait un doublement des teneurs en méthionine. Malheureusement cette protéine étant allergène, la transformation n'a pas pu être utilisée pour l'alimentation humaine.

Un autre gène codant pour une albumine 25, issu du tournesol, a été transféré chez le lupin (très utilisé pour l'alimentation animale en Australie) ; là encore, la teneur en méthionine a été doublée.

La qualité protéique de la pomme de terre pourrait aussi être améliorée par transgénèse.

Dans une première expérience, le gène de la globuline d'*Amaranthus hypochondriacus*, transféré chez la pomme de terre avec un promoteur spécifique du tubercule, a permis d'augmenter la teneur en protéines totales de plus de 35 à 45 % (35 % de 1%) avec une forte augmentation de la teneur en acides aminés indispensables (lysine, méthionine, cystéine et tyrosine) souvent multipliée par plus de 3. De plus, ces modifications étaient associées à une augmentation importante de la croissance et de la production de tubercules (taille et nombre). Dans une autre expérience, l'introduction de deux gènes bactériens codant pour des enzymes non sensibles au rétrocontrôle de la lysine (dont la dihydrodipicolinate synthétase, DHDPS) a multiplié par la teneur en lysine.

### **5.3. Qualité des acides gras (des huiles de soja, colza, tournesol)**

Les huiles végétales constituent 85% des graisses et huiles utilisées dans l'alimentation humaine. Cependant, selon leur composition en acides gras, elles n'ont pas toutes le même effet sur notre santé. Pour éviter des accidents cardio-vasculaires, les nutritionnistes recommandent d'utiliser dans notre alimentation des huiles végétales riches en acide oléique, et avec des acides gras polyinsaturés. Enfin, il faut apporter dans les aliments les acides gras essentiels non synthétisés par l'homme, comme l'acide linoléique et linoléique.

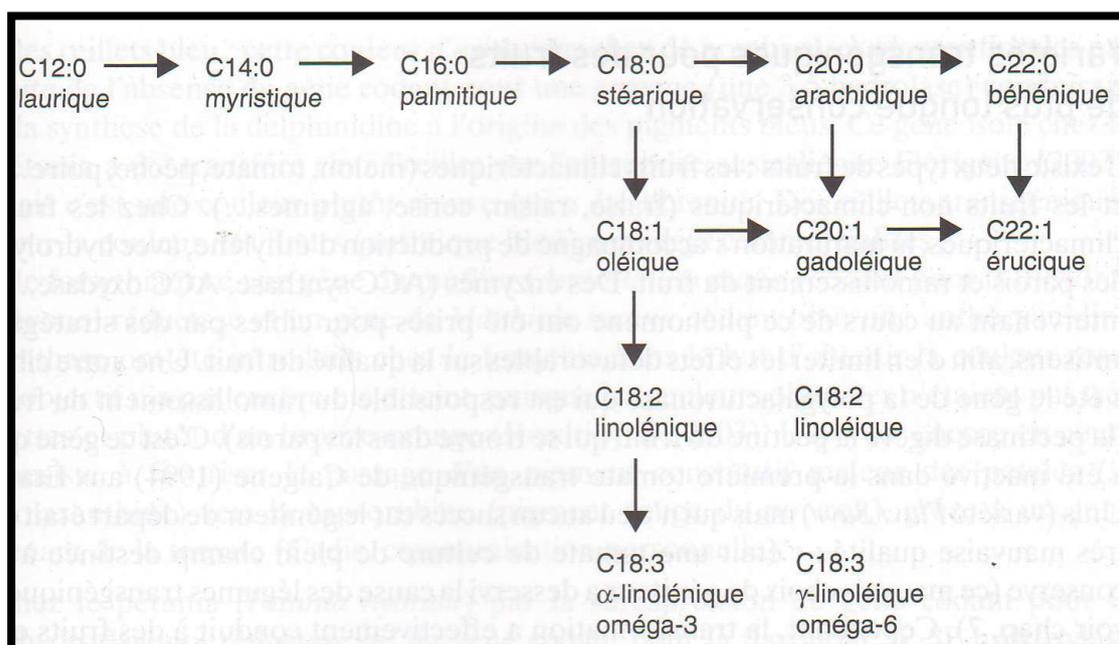
L'acide érucique, qui était présent dans l'huile de colza (avant 1978), provoquerait des lésions au tissu cardiovasculaire, bien que cela n'ait jamais été prouvé de façon indiscutable.

La qualité des huiles a d'abord pu être améliorée par l'utilisation de certains gènes. Ainsi, chez le colza, l'acide érucique a pu être éliminé grâce à l'introduction par croisement dans le matériel sélectionné des gènes qui bloquent sa synthèse

Un procédé industriel a été utilisé afin d'augmenter la stabilité des huiles est l'hydrogénation chimique, largement utilisée : elle augmente la concentration en acide oléique (C18 : 1), mais elle augmente aussi la teneur en d'autres acides gras qui ne sont pas sans risques pour la santé. La transgénèse est alors une solution.

La modification des acides gras par transgénèse est facilitée par le fait que leur synthèse forme une chaîne métabolique (**Figure 4**), on peut passer d'un acide gras à un autre par l'action de différentes enzymes (désaturases, élongases,...). Par exemple, sur la chaîne des acides gras saturés, le blocage de l'activité de l'enzyme qui permet de passer à l'acide gras à  $2n$  carbones à l'acide à  $2n + 2$  carbones va provoquer l'accumulation de l'acide gras à  $2n$  carbones. Ce blocage peut se faire par stratégie antisens. On peut ainsi produire un soja transgénique passant de 25 % à 85% d'acide oléique dans ses acides gras et avec peu d'acides gras polyinsaturés (linoléique et linoléique), sans aucun effet négatif sur les caractères agronomiques, par blocage de l'enzyme qui insère une double liaison en position 12 (désaturase d12). La présence d'acide oléique aux dépens des acides gras saturés diminuerait l'incidence des maladies cardiovasculaires ; il devient aussi envisageable de produire une huile qui puisse se conserver assez longtemps et être stable pendant la friture sans recours aux traitements d'hydrogénation qui augmentent les risques cardiovasculaires.

L'augmentation de la teneur en acides gras indispensables semble aussi possible de façon dirigée. Ainsi, un tabac à feuilles très riches en acide  $\gamma$ -linoléique (13 % des lipides foliaires) a été produit par transfert du gène codant pour la désaturase  $\delta 6$  de la bourrache. Les graines de bourrache étant naturellement riches en acide  $\gamma$ -linoléique, il devrait être possible de faire exprimer ce gène au niveau des graines, en particulier chez le tournesol, qui serait un bon candidat pour la transformation, puisque l'huile contient 50 à 70 % d'acide linoléique.



## Figure 4

### **5.4. Teneur en antioxydants des légumes et des fruits**

Les composés phénoliques du type flavonoïde sont très favorables pour la santé par leur pouvoir antioxydant. Ils sont produits par de nombreuses plantes, car ils jouent un rôle important dans leur croissance et développement et la résistance aux maladies. Cependant, dans les produits que nous consommons, ils sont en quantités insuffisantes. Chez la tomate, ils sont surtout localisés dans la peau, en faible quantité. La surexpression (avec un promoteur 35S) chez la tomate d'un gène de pétunia codant pour la chalcone isomérase, une enzyme clé de la synthèse des flavonoïdes, à l'origine des antioxydants, a multiplié par 78 la quantité d'un glucoside (la quercétine) qui a un pouvoir antioxydant très fort. Après transformation industrielle des fruits, l'effet d'enrichissement en flavonoïdes a été égal à 65% de celui observé au niveau des fruits frais.

### **5.5. Variétés transgéniques pour les tomates de plus longue conservation**

La longue durée de vie est un trait critique pour la qualité des fruits charnus car elle influence la commercialisation des fruits tant pour les producteurs que pour les consommateurs. La tomate (*Solanum lycopersicum*) a été principalement étudiée en tant qu'espèce modèle climatérique classique des fruits charnus pour l'analyse moléculaire.

La régulation de la maturation est l'une des préoccupations les plus importantes pour l'étude des espèces de fruits charnus. Le gène RIN est considéré comme le régulateur principal de la maturation des fruits de la tomate, son rôle est d'initier et accélérer les mécanismes physiologiques associés à la maturation, y compris la couleur rouge des pigments, le ramollissement des fruits et même la biosynthèse de l'éthylène. La mutation RIN inhibe le mécanisme de la maturation par conséquent le fruit ne passe jamais à la couleur rouge et la chair garde sa fermeté pendant plusieurs mois et l'augmentation de la production d'éthylène pendant la maturation cesse d'augmenter, ainsi la mutation permet de reproduire des cultivars avec une durée de vie prolongée. Le système CRISPR / Cas9 peut induire efficacement des mutations dans le gène RIN de la tomate. Les trois ARN guides examinés avec succès induisent des mutations ciblées qui ont affecté l'accumulation ou la structure de la protéine RIN. Les mutations

affectent clairement la maturation des fruits des plantes T0 et les allèles mutants ont été transmis de manière stable aux descendants T1.

La plupart des mutations induites aux trois sites de reconnaissance ont provoqué un décalage prématuré du codon stop. Les fruits mutants présentaient une couleur jaune à orange pâle au stade de la maturation et n'atteignent jamais la couleur rouge au niveau des fruits de type sauvage, même après un stockage de plusieurs semaines, indiquant clairement une inhibition de la maturation de ces fruits mutants.

## 6. Variétés transgéniques pour la santé

### Des plantes plus riches en vitamines : exemple du riz doré

Le riz est dépourvu de vitamine A, indispensable au bon fonctionnement de la vision. Dans les populations qui se nourrissent essentiellement de riz il en résulte une carence plus marquée en vitamine A, avec ses conséquences, la cécité.

Face à une telle situation, différentes approches ont été et sont toujours tentées. La première solution est d'essayer de développer des aliments plus riches en vitamine A. On peut enrichir les aliments traditionnels comme le sucre, l'huile, le blé, le riz, mais cela pose des problèmes technologiques, la vitamine A étant sensible à l'oxydation. La mise au point de variétés de plantes riches en pro-vitamine A et correspondant aux espèces déjà cultivées dans les pays concernés apparaît donc comme une solution plus facile à mettre en œuvre.

Un riz transgénique - dit riz doré (Golden rice) à cause de sa couleur - riche en  $\beta$ -carotène (pro-vitamine A) a été mis au point. Dans ce riz transgénique, un précurseur du carotène synthétisé normalement dans l'albumen, le géranylgeranyl diphosphate, est transformé en phytoène par la phytoène synthétase, lui-même transformé en  $\beta$ -carotène par l'action de 3 enzymes : la phytoène désaturase, la  $\beta$ -carotène désaturase et la lycopène  $\beta$ -cyclase. Au total, cette transformation a nécessité l'introduction de 4 gènes qui proviennent soit d'une plante, le narcisse *Narcissus pseudonarcissus* (gènes de la phytoène synthase, de la phytoène désaturase et de la lycopène  $\beta$ -cyclase), soit de la bactérie *Erwinia uredovora* (le gène de la  $\beta$ -carotène désaturase)

Ce riz transgénique pourrait aider à résoudre les problèmes de carence en vitamine A. Pour couvrir la totalité des besoins, il faudrait plus d'un kilogramme de riz par jour pour un enfant de huit ans, ce qui est irréaliste.

D'autres travaux vont bien au-delà de cet espoir « Golden rice 2 » obtenu par une autre équipe de recherche ; accumule 23 fois plus de provitamine A que le premier

prototype. Ces progrès spectaculaires ont été obtenus en remplaçant le gène de la phytoène synthase du narcisse par un gène de la même enzyme mais cloné chez le maïs. Avec un tel progrès, il devient alors possible par ce riz d'envisager de limiter fortement le risque de carence en vitamine A. Pour satisfaire les besoins, il suffirait en effet pour un enfant de deux-trois ans de consommer 72 g de ce nouveau riz par jour, ce qui devient assez réaliste.