



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie et Ecologie Végétale

قسم : بيولوجيا إيكولوجيا النبات

Polycopié de cours

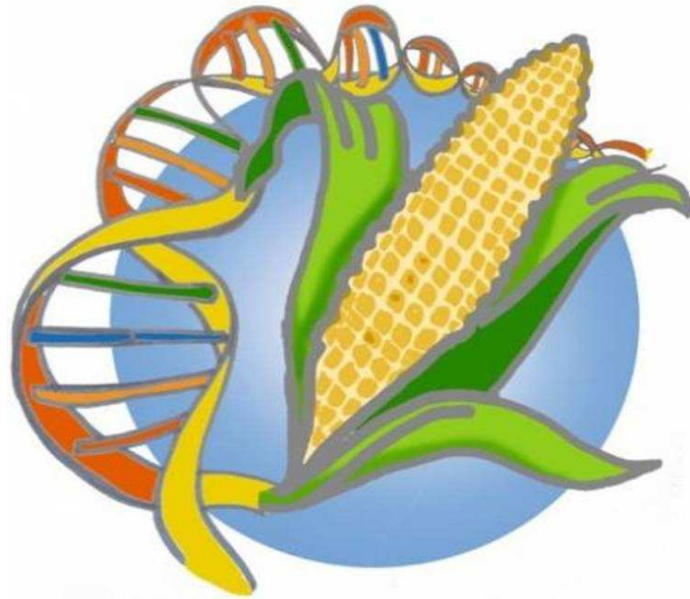
Destiné aux étudiants en :

Master 1 « Biotechnologie et génomique végétale »

De

TRANSGENESE VEGETALE

Réalisé par : Dr. Benabdoun Faïza Meriem



Année universitaire : 2019 - 2020

TABLE DES MATIERES

I. Introduction sur la transgénèse végétale	1
1. La sélection variétale classique	1
2. Comment les biotechnologies modernes ont déjà et peuvent encore y contribuer ?	2
3. Qu'est ce qu'un OGM ?	3
4. Qu'est ce que la transgénèse végétale ?	4
5. Historique de la transgénèse	4
6. Quelques chiffres	5
7. Les différentes stratégies de la transgénèse	9
7-1. Introduire un nouveau caractère	9
7-2. Inactiver un caractère	9
II. Technique de construction des plantes transgéniques : Cas du tabac	9
1. Identifier et isoler un gène d'intérêt	10
2. Réaliser une construction chimérique	11
3. Transférer la construction génétique dans le génome d'une cellule végétale	11
4. Sélectionner les cellules végétales transformées et régénération d'une plante entièrement transformée	12
5. Evaluer les plantes transformées	13
6. Incorporer le transgène dans une lignée commerciale élite	14
III. <i>Agrobacterium</i> et le transfert de gènes chez les végétaux	14
1. Généralités sur les agrobactéries	14
2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	16
2.1. Formation de la galle du collet (<i>crown gall</i>)	16
2.2. Structure du génome d' <i>A. tumefaciens</i>	17
2.3. Organisation du plasmide Ti « pTi : <i>Tumor inducing</i> »	18
2.4. Processus d'infection	22
2. <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	27
2.1. Formation des chevelus racinaires (<i>hairy roots</i>)	27
2.2. Organisation du plasmide Ri (pRi : <i>Root inducing</i>)	29
2.3. Processus d'infection	30
IV. Méthodes directes de transfert de gènes chez les plantes	30
1. Transfert dans les protoplastes	30
1.1. Méthode chimique : utilisation du PEG	31
1.2. Lipotransfection	31
1.3. Electroporation	32
1.4. Micro-injection	33
2. Biolistique	34
3. Agrobiolistique	36
V. Vecteurs de transformation	38
1. Vecteurs dérivés du plasmide pTi d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38

TABLE DES MATIERES

1.1. Système de transfert par co-intégration (plasmide navette)	39
1.2. Système de transfert binaire par conjugaison triparentale (plasmide binaire)	39
2. Vecteurs de transfert direct	41
3. Séquences d'ADN introduites dans le génome végétal	41
3.1. Promoteurs et activateurs transcriptionnels	41
3.2. Gènes de sélection	45
3.3. Gènes rapporteurs	45
VI. Transfert d'ADN et obtention de plantes transgéniques	49
1. Régénération <i>in vitro</i> et <i>in planta</i> des plantes transgéniques	49
1.1. Culture <i>in vitro</i> des plantes transformées avec <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	49
1.2. Culture <i>in vitro</i> des plantes transformées avec <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	49
1.3. Imbibition des graines	49
1.4. Agroinfiltration	50
2. Caractérisation moléculaire des transformants	51
3. Caractérisation biochimique des transformants	51
4. Tests supplémentaires	52
VII. Applications agronomiques et industrielles	52
1. Dans le secteur agronomique	52
1.1. Des plantes résistantes aux herbicides	52
1.2. Des plantes protégées contre les ravageurs	54
1.3. Des plantes résistantes aux stress abiotique	57
1.4. Des plantes décoratives	59
1.5. Des plantes mâles stériles	59
2. Dans le secteur industriel	60
2.1. Production de pâtes à papier	60
2.2. Les huiles industrielles	60
2.3. Les colorants	61
3. D'autres applications	61
3.1. Dans le secteur agroalimentaire	61
3.2. Dans le domaine médical	64
VIII. Plantes transgéniques et leurs impacts sur l'environnement et la santé	65
1. Impact des PGM sur l'environnement	65
1.1. Effet direct des PGM sur l'environnement	65
1.2. Effets indirects des PGM sur l'environnement	68
2. Impact des PGM sur la santé	69
2.1. La toxicité	70
2.2. Les allergies	70
2.3. Les gènes marqueurs résistants aux antibiotiques	71
Références bibliographiques	72

La transgénèse végétale

I. Introduction sur la transgénèse végétale

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

1. La sélection variétale classique

Les méthodes classiques de sélection restent nécessaires, en particulier pour les caractères quantitatifs et multigéniques. Ainsi, de nouveaux gènes ont été acquis chez certaines espèces au cours des croisements interspécifiques comme pour le cas de la tomate. On note que 10% de son génome (3000 gènes) provient de croisements avec d'autres espèces.

Nous citons aussi l'exemple de la grande famille des choux qui s'est encore étoffée ces dernières années. Les nouveaux venus sont des choux-fleurs à la pomme orange ou violette (riches en anthocyanes). Des couleurs qui n'ont pas été obtenues par un tour de passe-passe génétique, mais grâce à la patience des sélectionneurs. Effectivement, en 1970, un maraîcher de Holland Marsh (Ontario), a remarqué, à travers ses rangs de choux-fleurs blancs, un plant qui n'était pas comme les autres. La mutation du gène « Or » a donné naissance à des variétés de chou-fleur orange, riche en beta-carotène (provitamine A). Cette mutation par l'insertion d'un rétro-transposon, élément mobile des génomes, a créé véritablement un nouveau gène car s'il est transféré à d'autres espèces par transgénèse, il provoque également cette synthèse dans les tissus riches en plastides, comme le tubercule de la pomme de terre.

Les sélectionneurs de la société Deanehfeldt (aujourd'hui Syngenta) comprennent que le chou-fleur, sous l'effet du soleil, accumule des anthocyanes, un pigment naturel. D'année en année, ils conservent alors les graines des plantes chez qui cette couleur s'exprime le plus. A chaque nouveau semis, tous les ans, ils renforcent le caractère violet. Il en fallait, de la patience ! Ils finissent par obtenir un chou-fleur à la pomme bien violette. Une nouvelle variété était née.

La transgénèse végétale

Un autre phénomène a été observé chez les grains de raisin de la variété Cabernet qui doivent leur couleur à des pigments rouges « les anthocynes ». Dans les grains de la variété Chardonnay, l'insertion d'un rétro-transposon dans le promoteur du gène d'une enzyme nécessaire à la synthèse des anthocyanes a entraîné son inactivation. L'élément mobile a détruit le promoteur du gène réduisant ce dernier au silence et les grains Chardonnay sont devenus blancs.

Au cours des 60 dernières années, les rendements des principales cultures ont été multipliés par cinq. L'amélioration génétique a contribué pour plus de 50%. Compte tenu du contexte actuel, l'augmentation des besoins en produit agricoles est à plus de 70%. De ce fait, l'amélioration génétique devra faire plus et mieux. Le développement de la génomique facilite et augmente la puissance de ces approches et ouvre de nouvelles perspectives de sélection génomique. Ainsi, les biotechnologies ont permis d'élargir la base génétique utilisable et en fait progresser les connaissances, d'envisager une véritable ingénierie génétique.

Les biotechnologies ne modifient pas les contraintes classiques qui s'imposent à l'amélioration des plantes et à l'agriculture (maintien de la biodiversité, apparitions de résistances aux herbicides, maladies, prédateurs ou d'effets non attendus). Mais elles offrent des outils supplémentaires pour y répondre. Que cela soit pour l'amélioration conventionnelle ou reposant sur les biotechnologies, la disponibilité/diffusion des ressources génétiques reste un facteur clef et stratégique.

2. Comment les biotechnologies modernes ont déjà et peuvent encore y contribuer ?

Entre les méthodes classiques de sélection variétale et l'amélioration par les biotechnologies modernes qui dérive de progrès récents de la biologie moléculaire, deux différences fondamentales apparaissent. La sélection classique est un processus de longue haleine, il faut compter cinq à 15 ans, selon les espèces, pour créer une nouvelle variété ayant que les caractères désirables et la mettre sur le marché. De plus, les échanges génétiques qu'autorise la méiose dans ces conditions portent sur des chromosomes entiers ou de larges fragments chromosomiques, ce qui conduit au transfert simultané de caractères défavorables car la transmission des autres caractères indésirables se fait de manière aléatoire et en mélange.

La transgénèse végétale

La création d'un nouvel être vivant *via* les méthodes traditionnelles d'amélioration des plantes ne semble pouvoir provenir que du croisement d'individus d'une même espèce ou d'espèces apparentées. Sa sélection est assurée par sa viabilité intrinsèque, la viabilité de sa reproduction et son adaptation au monde environnant. Il ne semble pas envisageable de faire franchir aux gènes la barrière des espèces (sauf par l'intermédiaire des bactéries et des virus). En revanche, les biotechnologies modernes, notamment la transgénèse, transgresse les barrières sexuelles liées à la notion d'espèces. Toutes les manipulations transgéniques sont envisageables, il n'y a aucune limite à l'imagination des chercheurs, ainsi, certaines espèces peuvent échanger spontanément l'information génétique avec l'espèce végétale à améliorer.

Les choses ont changé depuis la découverte de l'universalité de la molécule d'ADN et de son fonctionnement a permis aux scientifiques d'envisager qu'un gène de n'importe quelle espèce puisse être ajouté et fonctionner chez n'importe quelle autre espèce et créer un « OGM » comme pour le cas du gène *rb* de *Solanum bulbocastanum* transféré vers une autre variété de pomme de terre cultivée pour la rendre tolérante à *Phytophthora infestans* (champignon responsable du mildiou).

3. Qu'est ce qu'un OGM ?

Un OGM (*Organisme Génétiquement Modifié*) ou GMO (*Genetically Modified Organism*) est un organisme vivant dont on a modifié de façon non naturelle, c'est-à-dire, par le biais du génie génétique, ses caractéristiques génétiques initiales, par addition, suppression, remplacement ou surexpression d'un ou plusieurs gène(s) dit(s) « étranger(s) », ou d'un quelconque morceau de matériel génétique, nommé ADN. Ces derniers sont dotés de propriétés particulières dans un organisme afin que celui-là exprime ces propriétés. Il s'agit là de la définition générale, académique, elle vaut pour tous les OGM, quels qu'ils soient, et quel que soit leur secteur d'utilisation ou d'application.

Aujourd'hui, quand on évoque les OGM, l'on pense surtout à l'application des techniques de transformation génétique au règne végétal. Les plantes ainsi « transformées » sont également appelées « plantes transgéniques ». Ce terme a fait couler beaucoup d'ancre ces derniers temps, et l'on continue de débattre sur les bouleversements qui pourrait entraîner l'introduction de ces végétaux. Pour mieux appréhender les

La transgénèse végétale

interrogations que suscite la transgénèse, il convient avant tout d'en connaître les principes scientifiques. Que sont donc ces végétaux transgéniques et quelles techniques met-on en œuvre pour les obtenir ?

4. Qu'est ce que la transgénèse végétale ?

La transgénèse est un outil du génie génétique, qui complète les méthodes traditionnelles d'amélioration des plantes quand ces dernières se heurtent à des impossibilités. Il s'agit en fait du transfert par transformation génétique d'une version « construite » d'un gène. De nos jours, de nombreux génomes ont été intégralement séquencés dont le génome humain. Il est donc désormais possible d'isoler une séquence d'ADN codant une protéine d'intérêt.

Pour le sélectionneur, il s'agit d'un moyen de créer un caractère qui n'existe pas dans l'espèce considérée ni dans ses apparentées, comme par exemple, la résistance aux larves d'un coléoptère. Ce gène peut être construit à partir d'une séquence présente dans la même espèce ou dans une espèce très différente (micro-organisme, animal).

Du point de vue méthodologique, la transgénèse s'apparente à la mutagenèse. En effet, on peut, théoriquement du moins, imaginer, par une succession de mutations repérées au niveau de la séquence d'ADN, reconstruire *in vivo* une séquence et donc un gène et une fonction qui n'existerait pas dans une espèce. Une telle méthode ne conduit pas à une PGM (plante génétiquement modifiée) car l'ADN n'a jamais quitté les cellules de l'espèce.

5. Historique de la transgénèse

Depuis le début du 20^{ème} siècle, les approches génétiques consistaient à générer des mutants (par traitements chimiques, rayons X, ...), et à étudier les conséquences visibles (le phénotype) des mutations. Durant les années 1970, les biologistes ont mis au point des méthodes permettant de recombiner l'ADN de façon dirigée, il s'agit de découper des fragments d'ADN d'intérêt puis les insérer dans le génome d'un organisme hôte. Ces méthodes ont tout d'abord été utilisées pour élucider les fondements moléculaires des phénomènes biologiques. On parle de génie (ou ingénierie) génétique pour parler de l'utilisation des méthodes d'ADN recombinant pour des applications biotechnologiques.

La transgénèse végétale

La plupart des physiologistes du monde végétal étaient sceptiques. Il fut l'un des rares à y croire. Jeff Schell est parvenu, à force de persévérance, à créer le premier outil permettant de transférer un gène étranger dans une plante grâce aux découvertes majeures sur des tumeurs provoquées par deux bactéries du sol, *Agrobacterium tumefaciens* et *A. rhizogenes*. Dès 1974, ce chercheur en génétique à l'université de Gand en Belgique puis directeur de l'Institut Max Planck (1978), et son collègue Marc Van Montagu, découvrent les gènes bactériens responsables de cette maladie et révèlent qu'ils sont portés sur une unité mobile nommée plasmide pTi. Leur hypothèse est alors que ce plasmide peut s'intégrer de façon stable dans le génome de la plante et provoquer ainsi une prolifération cellulaire.

En effet, il est apparu que ces bactéries ont la capacité naturelle de transférer une partie de leur information génétique à la plante hôte blessée. En exploitant cette propriété, on a réussi, grâce à des marqueurs sélectionnables, à transformer des plantes. Depuis lors, d'autres techniques directes de transfert d'ADN ont été mises au point, même si la technique la plus employée demeure l'utilisation d'*A. tumefaciens*. Actuellement, on compte de nombreuses plantes transgéniques appartenant à des groupes très divers (gymnospermes, dicotylédones, monocotylédones) et parmi elles, figurent des plantes de grande culture.

La transgénèse est une technique utilisée en laboratoire depuis les années 70. Les premiers travaux significatifs remontent, quant à eux, à 1983. Commercialement, son utilisation est beaucoup plus récente : le premier organisme transgénique commercialisé fut la tomate Flavr/Savr, qui a été cultivée aux États-Unis dès 1994. Trois ans plus tard, ce sont les cotons, maïs et sojas GM qui prédominaient dans ce pays. Le **tableau 01** nous renseigne des dates importantes des OGM.

6. Quelques chiffres

En 2012, 170.3 millions d'hectares d'OGM étaient cultivés dans 28 pays. Si l'Allemagne, la Pologne et la Suède ont arrêté la culture de plantes génétiquement modifiées, les surfaces consacrées aux biotechnologies sont en hausse en Europe. Cependant, malgré les arrêts de cultures OGM en Allemagne, Pologne et Suède, les OGM poursuivent leur progression.

La transgénèse végétale

Tableau 01 : Les OGM en quelques dates (Inf'OGM, 2000 ; Deleury *et al.*, 2003 ; Clive, 2011).

1973	- La mise au point des techniques de génie génétique.
1982	- Première application commerciale de cette technologie : la fabrication d'insuline pour le traitement du diabète.
1983	- Première plante transgénique : une plante de tabac qui résiste aux antibiotiques.
1987	- Premiers essais en champ en France (tabac).
1989	- Première souris transgéniques (prix Nobel de médecine à leurs auteurs en 2007).
1990	- La publication des directives européennes sur l'usage et la dissémination volontaire des OGM dans l'environnement. - La commercialisation du premier produit alimentaire modifié par la biotechnologie, la chymosine, est approuvée au Canada et aux États-Unis en tant que substitut à la présure, utilisée pour cailler le lait.
1994-1995	- Première autorisation de commercialisation donnée par l'Union européenne à un plant transgénique : un plant de tabac résistant au bromoxynil (herbicide). - Mise en vente au Canada de la première pomme de terre issue du génie génétique résistante au doryphore de la pomme de terre. Cette pomme de terre n'est plus commercialisée présentement. - Approbations américaine et canadienne de la tomate transgénique Flavr/Savr, à mûrissement retardé. Cette tomate n'est plus commercialisée présentement.
1996-1997	- Premières plantes transgéniques commercialisées aux États-Unis pour tolérer un herbicide et résister aux insectes : le soja Roundup Ready et le coton Bollgard.
1998	- Premières autorisations de cultures de plantes OGM en Europe.
1999	- moratoire sur les plantes OGM instauré de fait en Europe par le veto de sept pays de l'Union (Autriche, Belgique, Danemark, France, Grèce, Italie, Luxembourg).
2001	- Nouvelle directive européenne sur les OGM.
2003	- Entrée en vigueur du Protocole de Cartagena encadrant les mouvements des OGM entre les frontières des pays membres de ce traité.
2004	- Entrée en vigueur de nouveaux règlements sur l'étiquetage et la traçabilité et levée du moratoire en Europe.
2005	- Autorisation et culture en Europe du maïs MON810.
2008	- Arrêt de la culture de cette plante en France et loi en préparation.

La transgénèse végétale

En 2012, les surfaces cultivées ont augmenté de 6%, indique le rapport publié en février par le service international pour l'acquisition d'applications biotechnologiques. La croissance des plantations génétiquement modifiée est plus forte dans les pays émergents (11%) que dans les pays industrialisés (3%). Le Soudan et Cuba ont planté pour la première fois des OGM en 2012, portant à 19 le nombre de pays émergents cultivateurs.

Après 20 ans de croissance continue, les surfaces plantées en OGM ont reculé pour la première fois en 2015 avec 178,2 millions d'hectares contre 180 millions en 2014 et 175 millions en 2013. En 2016, les surfaces OGM sont à nouveau reparties à la hausse avec une augmentation de 3 % des surfaces plantées à 185,1 million d'hectares dans 26 pays dont 19 pays en voie de développement et 7 pays industrialisés, ont cultivé des plantes GM. La superficie mondiale des cultures PGM dans les différents pays producteurs est mentionnée sur le **tableau 02**.

Les quatre principales cultures GM, soja, maïs, coton et colza, par ordre décroissant de superficie, étaient les plantes les plus adoptées dans les 26 pays. La superficie cultivée avec du soja GM étaient la plus importante avec 91.4 millions d'hectares, ce qui représente 50% de la superficie mondiale de 185.1 millions d'hectares cultivée avec toutes les plantes GM. Bien que la superficie du soja montre seulement une diminution marginale de 1% par rapport à 2015 (92.7 millions d'hectares), elle est encore importante avec 91.4 millions d'hectares. En se basant sur la superficie mondiale individuelle, 78% du soja, 64% du coton, 26% du maïs et 24% du colza étaient des plantes GM en 2016. Les empilements de caractères occupaient 41% de la superficie mondiale, suivi par la tolérance aux herbicides.

Quant au nombre d'agriculteurs cultivant PGM, il a été évalué à : 12 millions en 2007 dont 90% d'exploitants à faibles ressources cultivant du coton Bt , correspondant à : 7,1 millions d'agriculteurs de différentes provinces de Chine et 3,8 M en Inde (coton Bt), des milliers d'agriculteurs d'Afrique du Sud (maïs, soja, coton) et plus de 100 000 aux Philippines (maïs Bt). Récemment, en 2017, 189.800.000 hectares de cultures GM ont été plantés par 17 millions d'exploitants agricoles, et les surfaces OGM sont à nouveau reparties à la hausse avec 189,8 millions d'hectares, dans 26 pays.

La transgénèse végétale

Tableau 02 : Superficie mondiale des plantes génétiquement modifiées en 2016 par pays (en millions d'hectares) (ISAA, 2016).

Rang	Pays	Superficie (millions d'hectares)	Plantes GM
1	USA*	72.9	Mais, soja, coton, colza, betterave sucrière, luzerne, papaye, courge, pomme de terre
2	Brésil*	49.1	Soja, maïs, coton
3	Argentine*	23.8	Soja, maïs, coton
4	Canada*	11.6	Colza, soja, maïs, coton, betterave sucrière, luzerne
5	Inde*	10.8	Coton
6	Paraguay*	3.6	Soja, maïs, coton
7	Pakistan*	2.9	Coton
8	Chine*	2.8	Coton, papaye, peuplier
9	Afrique du Sud*	2.7	Mais, soja, coton
10	Uruguay*	1.3	Soja, maïs
11	Bolivie*	1.2	Soja
12	Australie*	0.9	Coton, colza
13	Philippines*	0.8	Mais
14	Myanmar	0.3	Coton
15	Espagne*	0.1	Mais
16	Soudan*	0.1	Coton
17	Mexique*	0.1	Coton, soja
18	Colombie*	0.1	Coton, maïs
19	Vietnam	<0.1	Mais
20	Honduras	<0.1	Mais
21	Chili	<0.1	Mais, soja, colza
22	Portugal	<0.1	Mais
23	Bangladesh*	<0.1	Brinjal/Aubergine
24	Costa Rica	<0.1	Coton, soja, ananas
25	Slovaquie	<0.1	Mais
26	République Tchèque	<0.1	Mais
	Total	185.1	

*18 méga-pays GM cultivant au moins 50 000 hectares de plantes GM
 **Arrondi à la centaine de milliers la plus proche.

La transgénèse végétale

7. Les différentes stratégies de la transgénèse

7-1. Introduire un nouveau caractère

Le transfert de gènes s'accompagne généralement de l'apparition d'un nouveau 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 (**Figure 01**).

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

7-2. Inactiver un caractère

Dans ce cas, le transfert de gènes ou d'un ARN induit l'inhibition d'une fonction déjà existante. La stratégie anti-sens fut la première utilisée. Elle consiste à bloquer la traduction d'un gène cible. Une copie « inversée » de ce gène est introduite, d'où le nom de la technique. Les 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 ne peut être traduite et elle est dégradée. Les protéines à l'origine de la fonction ne sont donc pas produites et le caractère ne s'exprime donc plus (**Figure 01**). Cette technique a permis d'obtenir des espèces végétales à teneur en lignine réduite, des melons à maturation retardée, ou des pommes de terre riches en amylopectine.

II. Technique de construction des plantes transgéniques : Cas du tabac

Les plantes peuvent-être régénérées assez facilement à partir d'une cellule somatique. La cellule végétale est donc apparue comme l'unité fondamentale dans le processus de la création d'une lignée de végétaux transgéniques. Sa propriété de totipotence lui confère, *in vitro*, dans des conditions contrôlées, la capacité de régénérer une plante entière. En revanche, la paroi pectocellulosique cellulaire rigide constitue un obstacle au transfert de gène, qui est contourné par l'utilisation des bactéries du genre *Agrobacterium* possédant un système naturel de transfert de gènes aux cellules végétales.

La transgénèse végétale

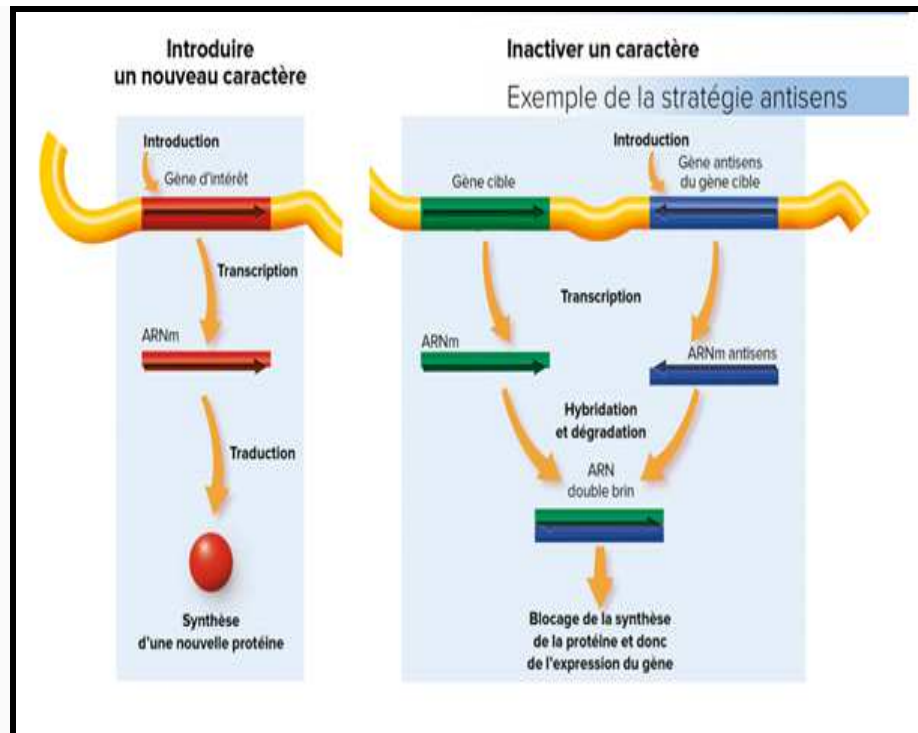


Figure 01 : La transgénèse : différentes stratégies (gnis-pedagogie, s.d.).

La transformation génétique d'une espèce végétale requiert plusieurs étapes, qui sont actuellement maîtrisées pour de nombreuses plantes. Afin de bien les distinguer, nous allons prendre l'exemple d'une plante de grande culture, le tabac, et décrire sa transformation au moyen de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*.

1. Identifier et isoler 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. Dans notre exemple, le gène d'intérêt que l'on souhaite transférer, code une toxine insecticide (Bt) qui confère une résistance aux insectes. Ce gène a été isolé chez *Bacillus thuringiensis*, bactérie dont certaines souches empêchent la prolifération de larves de lépidoptères.

La transgénèse végétale

2. Réaliser une construction chimérique

La transgénèse constituée du gène « d'intérêt » et du gène « marqueur » sont intégrés dans un vecteur de transformation (ADN plasmidique). Ce gène marqueur confère dans la plupart des cas une résistance à un antibiotique et permet de sélectionner les cellules qui ont intégré le gène d'intérêt. Quant au dernier, il est très souvent remplacé au stade expérimental par un gène « rapporteur » dont l'expression est aisément mesurable et observable en histologie.

Dans le cas du tabac, la construction chimérique est composée de gènes artificiels (ou composites) suivants : - Le gène d'intérêt Bt qui leur conférant une résistance aux principaux insectes nuisibles (la pyrale) ; - Le gène marqueur composé d'une séquence codant un gène bactérien (séquence codante de la néomycine phosphotransférase II ou *nptII*) qui leur confère la résistance à un antibiotique, la kanamycine, généralement toxique pour les cellules végétales ; - un promoteur et un terminateur. Les deux dernières parties sont nécessaires pour pouvoir faire fonctionner le gène associé dans un environnement nouveau, la cellule végétale. La construction est ensuite multipliée (clonée) dans *Escherichia coli* afin de disposer d'une quantité suffisante d'ADN pour son introduction dans les cellules végétales que l'on veut transformer.

3. Transférer la construction génétique dans le génome d'une cellule végétale

Le vecteur de transformation génétique peut être intégré dans la cellule végétale soit par les méthodes de transfert direct dont : la biolistique, ou par la transformation biologique qui requiert l'intervention des bactéries telluriques du genre *Agrobacterium*. Dans notre exemple, nous ferons appel à *A. tumefaciens*, possédant dans les conditions naturelles, la capacité unique de transférer une partie de son matériel génétique, l'ADN-T (T pour transfert), dans le génome de la cellule végétale, capacité que les chercheurs ont mise au service de la transgénèse.

Le plasmide porteur d'une région d'ADN-T incluant les transgènes est introduit dans les cellules bactériennes qui vont accomplir le transfert. Les disques foliaires du tabac (désinfectés et coupés au préalable) sont mis en contact avec les agrobactéries en culture liquide (on parle de co-culture) pendant un certain temps qui varie de quelques minutes à quelques heures.

La transgénèse végétale

Au niveau de la coupure, les cellules végétales sont blessées, ce qui stimule le système naturel de transfert de gènes d'*A. tumefaciens*. Les explants sont ensuite transférés dans un milieu nutritif (co-culture de 2 à 6 jours) (**Figure 02**).

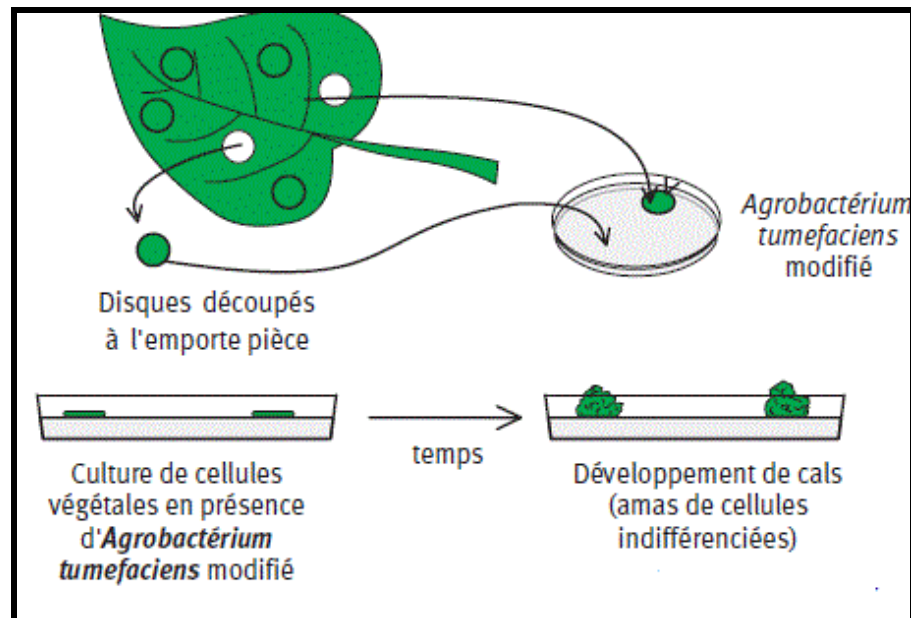


Figure 02 : Co-culture du tabac et développement de cals (biotech-ecolo, s.d.).

4. Sélectionner les cellules végétales transformées et régénération d'une plante entièrement transformée

Après avoir lavé les explants pour éliminer l'excès des agrobactéries, les fragments de feuilles du tabac sont ensuite incubés en présence de kanamycine et de céfotaxime, sur un milieu nutritif additionné de phytohormones. La céfotaxime est un antibiotique ayant comme rôle de stopper la croissance des agrobactéries transportées avec le disque foliaire. Seules les cellules transformées, qui ont intégré le gène *nptII*, résisteront à la kanamycine et donc proliféreront sur ce milieu sélectif.

Après sélection des cellules transformées, il faut régénérer de nouvelles plantes transgéniques en culture *in vitro*. Les cellules transformées se développent d'abord en cals, larges amas de cellules indifférenciées (voire **figure 02**). Ce phénomène est observé dans un petit nombre de cellules de l'explant d'où la nécessité de multiplier les cellules transformées. Après quelques semaines, on observe le développement de tige.

La transgénèse végétale

Le milieu de culture doit posséder une balance hormonale (rapport cytokinines/auxines) favorable à la différenciation de bourgeons dans les cellules transformées. Les explants sont alors placés dans un nouveau milieu de culture permettant le développement des racines (**Figure 03**). Dans notre exemple du tabac, le milieu de culture contient, en plus d'éléments minéraux, une cytokinine, la benzyladénine, et une auxine, l'acide naphthalène acétique. Quand les racines sont suffisamment développées, les vitroplants sont repiqués en pot et acclimatés en serre conçue spécialement pour les PGM. 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 transgènes sont intégrés de manière stable dans le génome et sont donc héréditaire. On peut donc multiplier le tabac transgénique par voie sexuée. Le temps écoulé entre l'introduction du transgène dans les disques foliaires et l'obtention de la première descendance est généralement compris, dans le cas du tabac, entre 4 et 6 mois.

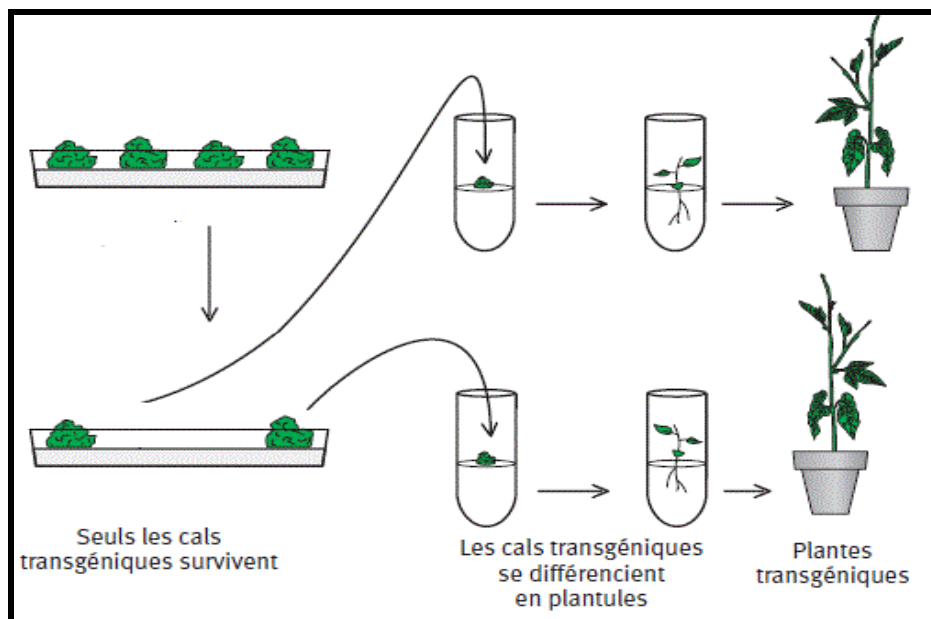


Figure 03 : Régénération *in vitro* du tabac transgénique (biotech-ecolo, s.d.).

5. Evaluer les plantes transformées

Statistiquement, 1/4 des plantes ne possèdent pas le gène de résistance ; c'est la proportion attendue pour un gène quelconque (lois de Mendel). Ce gène introduit se conduit comme n'importe quel autre gène : il fait alors partie du patrimoine génétique de la

La transgénèse végétale

plante que l'on qualifiera de transgénique. Il faut d'abord s'assurer qu'une plante sélectionnée par sa résistance à un agent de sélection, herbicide ou antibiotique, a bien intégré le gène d'intérêt dans son génome. Ensuite, l'événement de transformation doit être caractérisé. Ainsi des analyses moléculaires sont conduites pour confirmer l'insertion de la construction génétique dans leur génome.

6. Incorporer le transgène dans une lignée commerciale élite

La plante ayant intégré le gène d'intérêt et satisfaisant le mieux à l'évaluation agronomique est retenue, on parle de lignée mère. Toutefois, cette plante n'est généralement pas encore la variété commerciale. En effet, l'efficacité de transformation et de régénération étant dépendante du génotype, la plante qui a été transformée est d'un génotype facilitant ces étapes. C'est pourquoi les plantes retenues sont ensuite soumises à une succession de rétrocroisements afin d'introduire le gène dans le matériel élite et d'obtenir de nouvelles variétés commerciales exprimant ce caractère. Au cours de ces générations d'hybridation, seul le gène d'intérêt est conservé et le reste du patrimoine génétique de la lignée mère est éliminé. Le résultat de ce processus est l'obtention d'une lignée quasiment identique à la lignée élite, mais contenant le nouveau caractère transgénique. La variété transgénique obtenue est alors proposée à l'inscription. Toutes les étapes de la transformation génétique du tabac sont décrites sur la **figure 04**.

La Chine est l'un des pays qui ont commercialisé le tabac résistant aux insectes. D'autres plantes transgéniques (coton, tomate et maïs, par exemple) ont été produites selon ce même protocole et sont commercialisées, principalement en Amérique du Nord, mais aussi en Europe, en Amérique latine, en Asie et en Afrique du Sud.

III. *Agrobacterium* et le transfert de gènes chez les végétaux

1. Généralités sur les agrobactéries

Les bactéries du genre *Agrobacterium* sont naturellement présentes dans les sols et sont plus particulièrement retrouvées dans les sols rhizosphériques. Elles appartiennent à la famille des *Rhizobiaceae* dans la classe des alpha-protéobactéries. Ce genre comprend une douzaine d'espèces réparties en différents groupes taxonomiques. Plusieurs espèces d'agrobactéries sont des phytopathogènes de la plante.

La transgénèse végétale

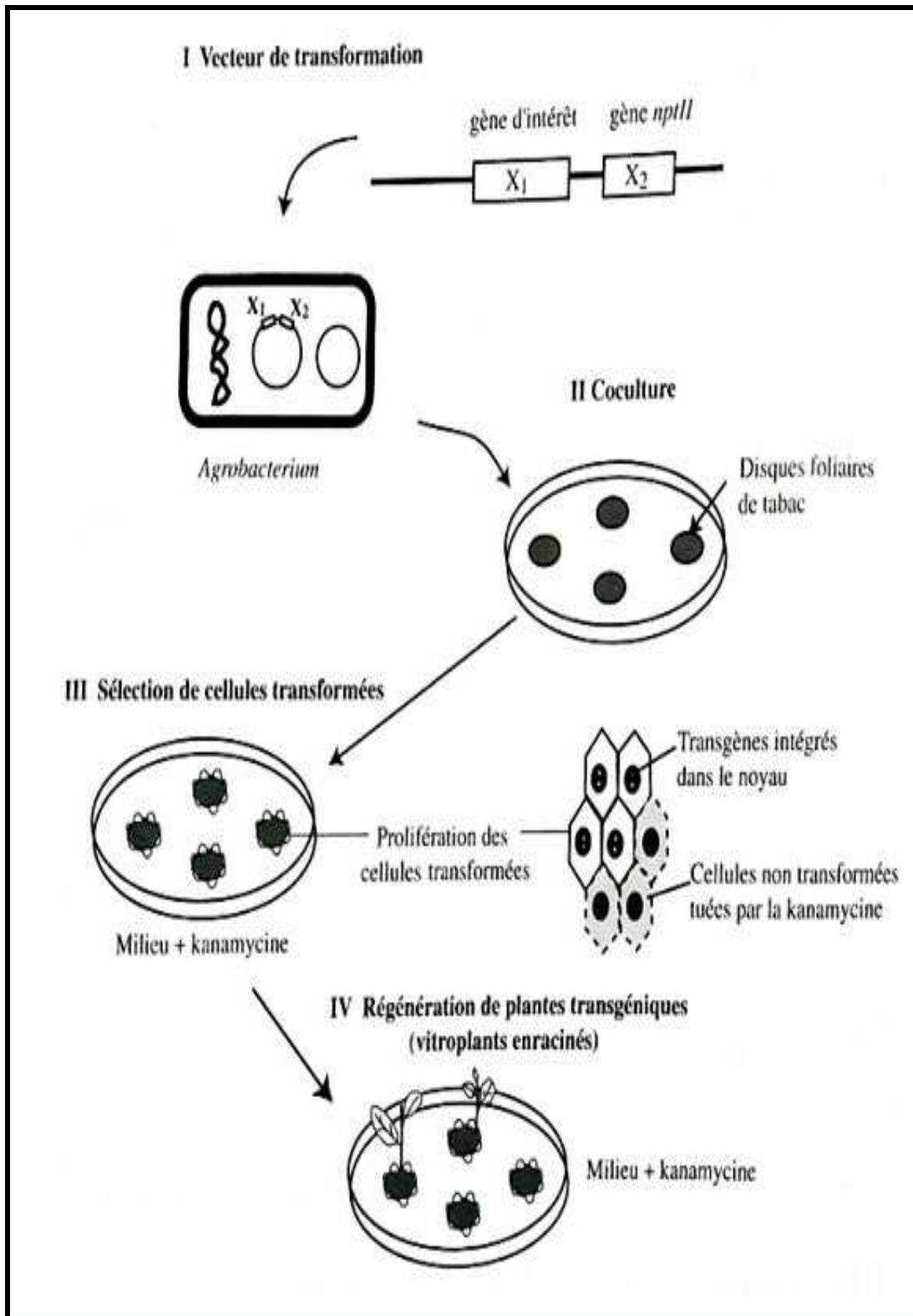


Figure 04 : Etapes de la transformation génétique du tabac via *Agrobacterium tumefaciens* (Crété, 2006).

La transgénèse végétale

En effet, en présence d'éléments génétiques particuliers certaines espèces dont *A. tumefaciens*, peuvent provoquer des maladies néoplastiques. On connaît trois autres espèces d'agrobactéries : *A. rhizogenes*, que nous décrirons plus loin, *A. radiobacter*, qui est une espèce non virulente, et *A. rubi*, l'agent du « *cane gall* », qui induit des tumeurs sur certaines dicotylédones telles que la ronce (*Rubus*).

Les agrobactéries sont des bacilles de coloration Gram négative dont la taille varie entre 0,6 à 1 µm sur 1 à 3 µm. Ces bactéries sont pour la plupart des aérobies strictes. Elles sont chimioorganotrophes, non sporulantes et sont très mobiles grâce à des flagelles péritriches. Elles utilisent comme source de carbone une grande variété de composés organiques. Leur température optimale de croissance est située entre 24 et 28 °C. Dans ces conditions et dans un milieu de culture favorable, leur temps de génération avoisine 120 minutes.

2. *Agrobacterium tumefaciens*

2.1. Formation de la galle du collet (*crown gall*)

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie isolée pour la première fois en 1907 dans un fragment de galle par Smith et Townsend sous le nom de *Bacterium tumefaciens*. Cette maladie affecte le développement et la productivité de nombreuses plantes dont un certain nombre sont d'intérêt agronomique comme les pommiers, les poiriers, les rosiers, etc ... Elle touche une large gamme de plantes : environ 640 espèces réparties dans 93 familles. L'étude approfondie du spectre d'hôte a mis en évidence un effet phytopathogène sur un grand nombre de dicotylédones et gymnospermes. En revanche, peu de monocotylédones développent des tumeurs. *Agrobacterium* est capable de se fixer et d'introduire de nouveaux matériels génétiques dans une cellule végétale. À la suite de ce contact, ces cellules végétales se multiplient de manière importante, donnant naissance à une formation tumorale située au niveau du collet, d'où le nom de cette formation : la galle du collet (*crown gall*) (**Figure 05**).

Ces tumeurs apparaissent au départ au niveau du collet de la plante puis au niveau des tiges et de la base des feuilles. Elles sont de couleur blanchâtre et de consistance molle, et sont plus ou moins sphériques avec une surface irrégulière. Leur taille peut atteindre parfois 30 cm de diamètre.



Figure 05 : Tumeurs de *crown gall* induite par *Agrobacterium tumefaciens* (Crété, 2006).

En vieillissant, les tumeurs prennent une teinte brun-noirâtre, elles durcissent et se craquellent pouvant être la cible de micro-organismes tels que *Phytophthora*, *Fusarium*, *Cylindrocarpon*..., qui participent au dépérissement de la plante infectée. Depuis 1974, on sait que cette induction est due au transfert d'un petit ADN plasmidique depuis la bactérie jusque dans le génome des cellules de la plante.

Une première caractéristique des tissus résultant de l'infection par *Agrobacterium tumefaciens* est qu'ils sont capables de croître indéfiniment, en absence de tout régulateur de croissance. La seconde caractéristique est leur aptitude à synthétiser une nouvelle classe de molécules de faible masse moléculaire, les opines, dérivés de sucres et d'acides aminés. Enfin, une dernière caractéristique est la présence simultanée de cellules végétales transformées et de cellules non transformées (**Figure 06**).

2.2. Structure du génome d'*A. tumefaciens*

La souche modèle *Agrobacterium tumefaciens* C58 a été complètement séquencée. Elle possède quatre réplicons : un chromosome circulaire (CcC58, 2,84Mb) 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, 2,07Mb), un plasmide cryptique At (pAtC58, 0,54Mb) et un plasmide Ti (« *Tumor inducing* », pTiC58, 0,21Mb). Son génome contient 5419 gènes codant pour des protéines dont plus de 60% possèdent une fonction putative attribuée par homologie de séquences.

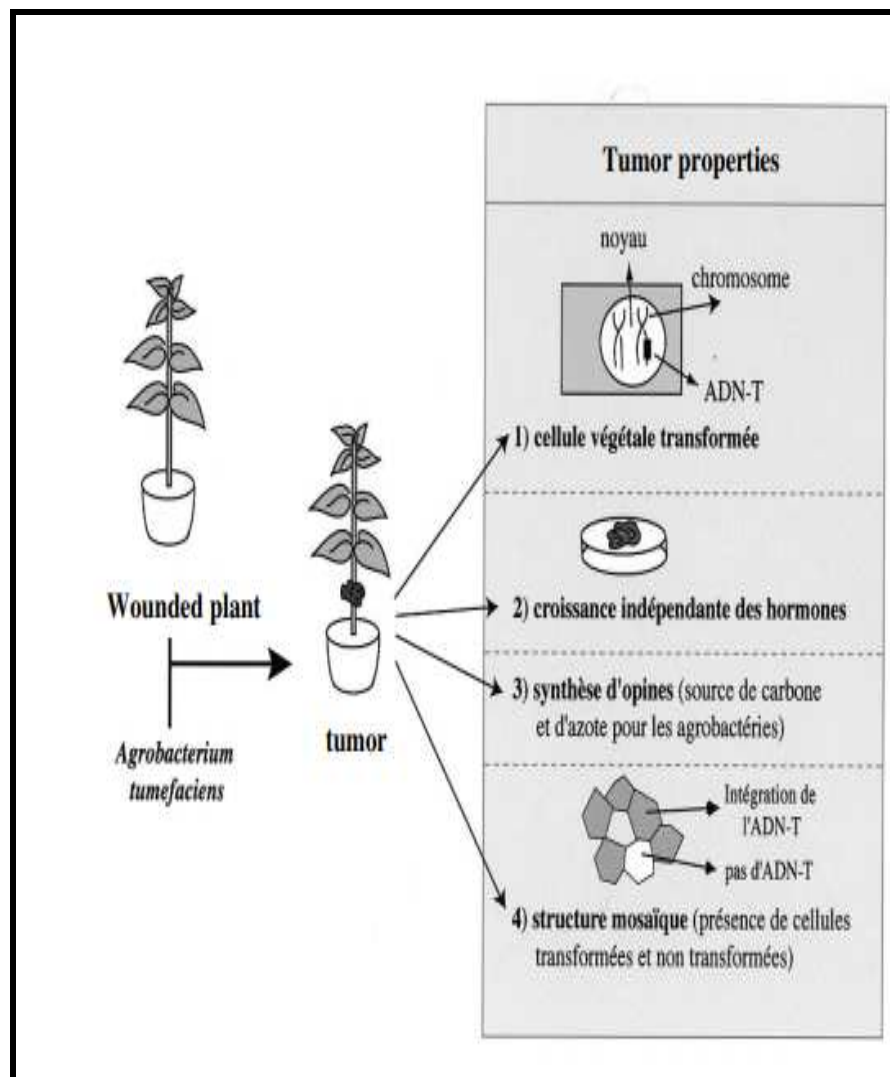


Figure 06 : Propriétés de la gall du collet (Franche et Duhoux, 2001).

2.3. Organisation du plasmide Ti « pTi : *Tumor inducing* »

Agrobacterium tumefaciens est capable d'injecter un ADN dans une cellule végétale où il s'insère dans le génome chromosomique. Cet ADN, qui peut circuler ainsi d'un organisme à un autre, est un fragment de plasmide : le plasmide Ti (*tumor inducing*). L'ADN qui est ainsi transféré est nommé ADN-T (*Transferred DNA*). Il a été rapidement proposé, une fois ce mécanisme connu, de le détourner dans un but de transgénèse. Pour cela, il suffit de remplacer l'ADN-T par un autre ADN portant un gène d'intérêt, par exemple.

La transgénèse végétale

Le plasmide pTi déterminant essentiel de la pathogénicité des agrobactéries, n'est présent qu'en un seul exemplaire dans les bactéries qui les hébergent. De la même façon que l'on parle des agrobactéries de souche à octopine ou à nopaline, on parlera de plasmide Ti à octopine, à nopaline, etc. Ce mégaplasmide est constitué d'un nombre de régions fonctionnelles qui sont : les deux bordures droite et gauche (BD et BR), la région de l'origine de réplication (ori), les gènes de transfert conjugatif (tra et trb), les gènes de virulence (vir), les gènes du catabolisme des opines (noc, acc, moc) et les gènes du T-DNA (Figure 07).

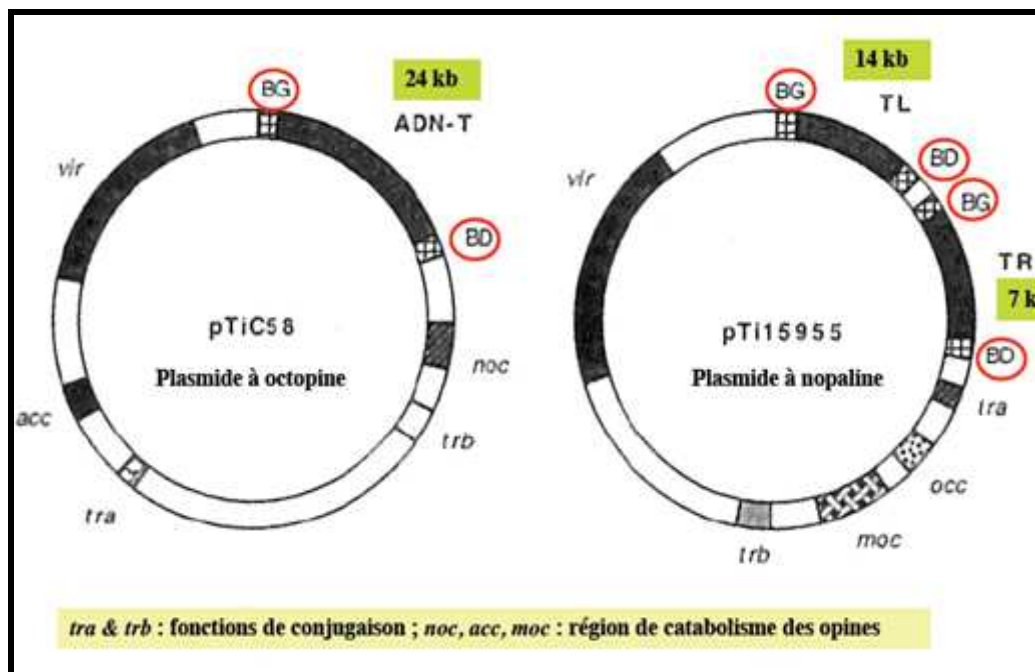


Figure 07 : Organisation des plasmides pTiC58 à octopine et à nopaline d'*Agrobacterium tumefaciens* (Franche, 2013).

a. ADN-T

L'ADN-T est délimité par deux séquences répétées, bordure droite RB (pour *right border*) et bordure gauche LB (pour *left border*), constituées par des séquences de 25 nucléotides. Ces séquences servent de sites de reconnaissance pour une endonucléase spécifique qui n'hydrolyse qu'un des deux brins d'ADN. Puis un processus d'excision-réparation aboutit à l'expulsion d'un fragment ADN simple brin pris en charge par des protéines SSB (*single strand binding*) tandis que le plasmide Ti est remis sous forme circulaire double brin.

La transgénèse végétale

C'est la région comprise entre les deux bordures qui est transférée. Elle contient les gènes qui confèrent à la plante des propriétés tumorales, c'est-à-dire qu'ils entraînent la prolifération continue et incontrôlée des cellules végétales (la tumorigénèse) par production d'hormones de croissance (auxine et cytokinine). Des gènes entraînant la biosynthèse de composés azotés particuliers appelés : opines sont également présents sur l'ADN-T.

✓ Les oncogènes

Par définition, un oncogène est capable par lui-même de causer une transformation néoplasique et de donner l'apparence du phénotype tumoral à la cellule qui le renferme. Chez *A. tumefaciens*, le terme oncogène semble approprié pour les gènes du T-DNA tels que *iaaM* et *iaaH* (du locus *tms*) codant pour les enzymes impliqués dans une nouvelle voie de biosynthèse de l'AIA (acide indole-3-acétique), auxine majeure endogène des plantes, *ipt* (du locus *tmr*) code une isopentenyl transférase qui catalyse la synthèse de la cytokinine isopentenyladenosine 5'MP à partir de l'isopentyl-pyrophosphate et 5'AMP (**Figure 08**).

✓ Les opines

Les opines (nopaline ou octopine) sont des protéines spécifiques des bactéries qui ne sont pas habituellement présentes dans les tissus sains. Relâchées dans le milieu, les opines favorisent la multiplication des souches pathogènes et détournent une partie de l'activité photosynthétique de la plante au profit des bactéries. Ces derniers servent de source de carbone, d'azote et d'énergie pour les bactéries (**Figure 08**).

b. Région de virulence

Sur le plasmide, en dehors de l'ADN-T, on trouve une région de virulence d'environ 30-40 kb, qui n'entraîne pas directement la formation de la maladie, mais est indispensable au transfert et à l'intégration de l'ADN-T. Cette région comprenant des gènes *vir* organisés en opérons est située proche de la frontière gauche de l'ADN-T. Elle est composée d'au moins 6 opérons essentiels au transfert de l'ADN-T (*virA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *G*), et de 11 opérons non essentiels (*virF*, *H*). La **figure 09** présente les principaux gènes *vir* du plasmide Ti à octopine et à nopaline.

La transgénèse végétale

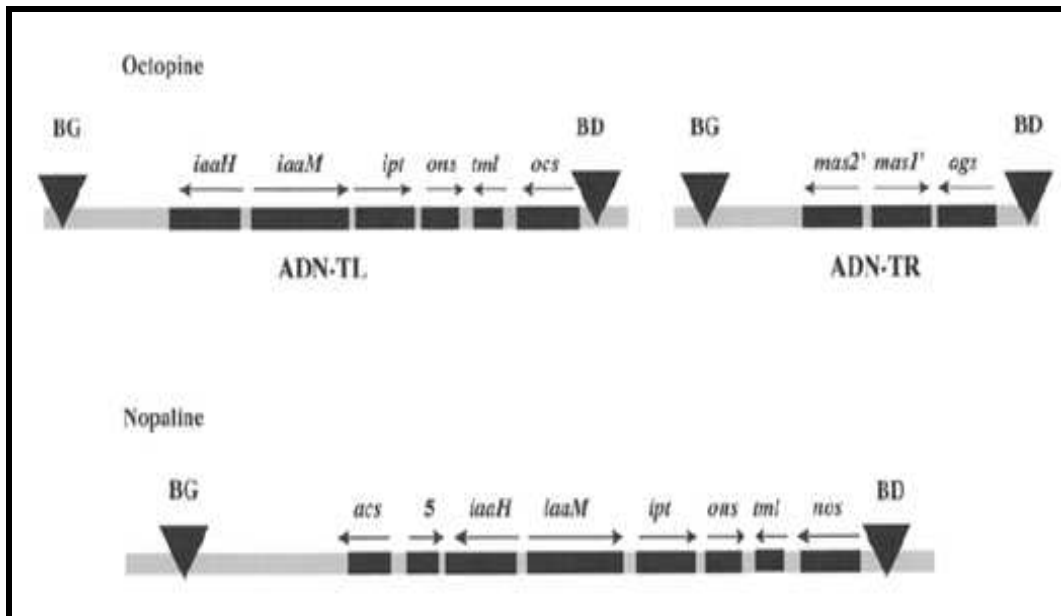


Figure 08 : Localisation des oncogènes et des gènes de biosynthèse d'opine dans la région T d'un plasmide à octopine et d'un plasmide à nopaline (Franche, 2013).

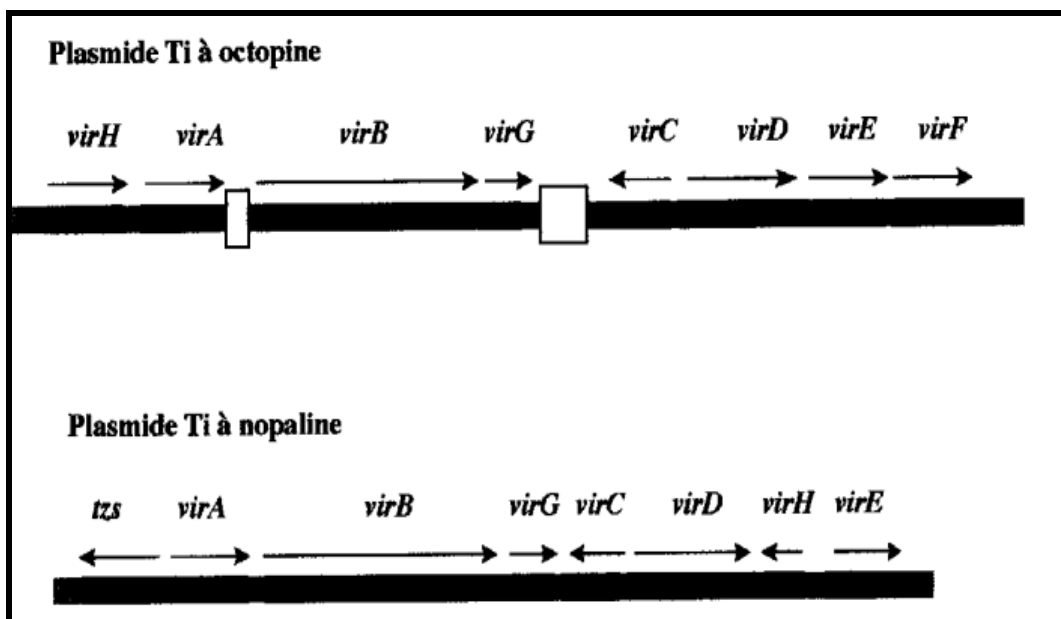


Figure 09 : Organisation de la région de virulence de plasmide Ti à octopine et à nopaline (Franche, 2013).

La transgénèse végétale

c. Région du catabolisme des opines

La région du catabolisme des opines est globalement appelée *opc*. Les gènes impliqués dans le catabolisme des opines sont regroupés en opéron : *noc* pour celui de la nopaline, *occ* pour celui de l'octopine et *acc* pour celui de l'agrocinopine. Pour être utilisées, les opines doivent pénétrer dans les bactéries. Ainsi, des protéines spécifiques sont nécessaires à leur transport.

d. Fonctions de réplication et de conjugaison

En dehors de la région T et de la région de virulence, l'autre moitié du plasmide Ti est occupée par des gènes impliqués dans des fonctions plasmidiques classiques de réplication du plasmide (région *ori*), d'incompatibilité (région *inc*) et de transfert conjugatif (région *Tra*). Ces gènes vont assurer le maintien du plasmide Ti dans les cellules bactériennes et sa propagation par conjugaison.

2.4. Processus d'infection

Le processus de transgénèse mise en place par *A. tumefaciens* grâce à la présence du plasmide Ti a permis la mise en évidence du lien entre la tumorigénèse et l'intégration de son ADN-T dans le génome de la cellule végétale infectée. Plus schématiquement, le cycle d'infection d'*A. tumefaciens* se décompose en trois étapes :

a. Reconnaissance et attachement des bactéries aux cellules végétales blessées

Dans les conditions naturelles, les cellules d'*A. tumefaciens* sont attirées vers les sites blessés, par chimiotactisme. Ceci est, en partie, une réponse à la libération de sucres et d'autres composés communs (acides aminés, dérivés phénoliques) exsudés par les plantes (**Figure 10**). Cependant, les agrobactéries qui hébergent le plasmide Ti répondent fortement parce qu'elles reconnaissent les composés phénoliques tels que l'acétosyringone, qui est très attractif même à très faible concentration. L'attachement des agrobactéries aux cellules de plantes fait intervenir différents éléments génétiques déterminés par le chromosome tels que les loci : *chvA*, *chvB*, *chvE*, et *cel*.

La transgénèse végétale

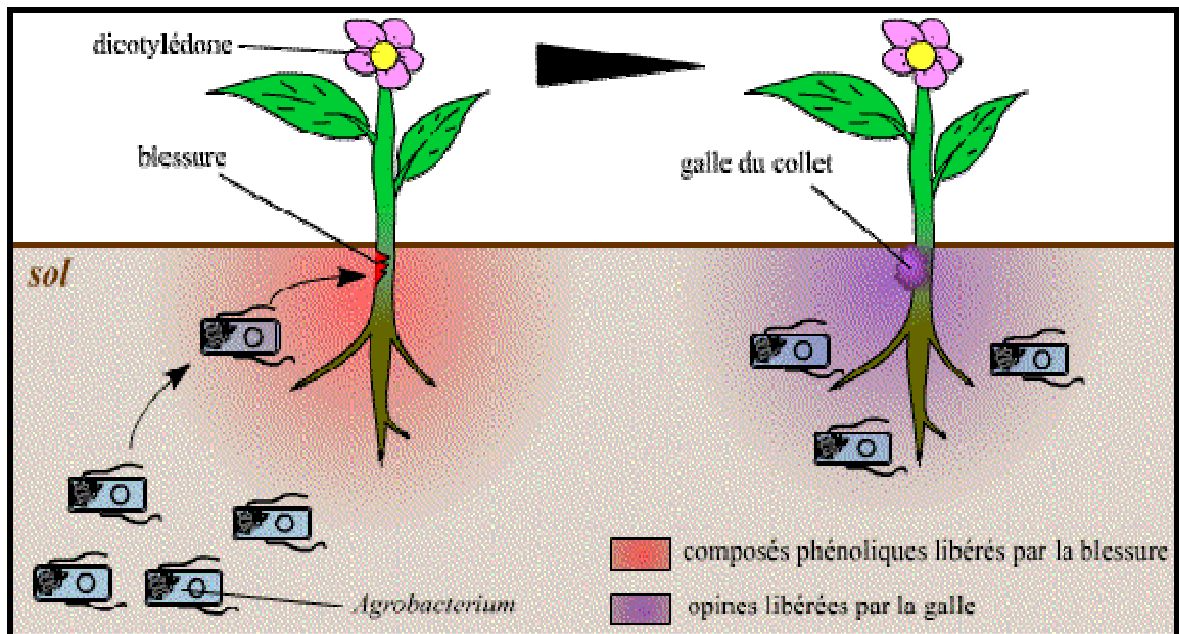


Figure 10 : Chimiotactisme entre la plante et les agrobactéries et libération des opines (Weider et Furelaud, 2003).

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'exsudat 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* (**Figure 11**). Cette dernière étape permet de stabiliser le contact avec l'hôte et permet d'engager le processus de transfert du T-DNA.

La transgénèse végétale

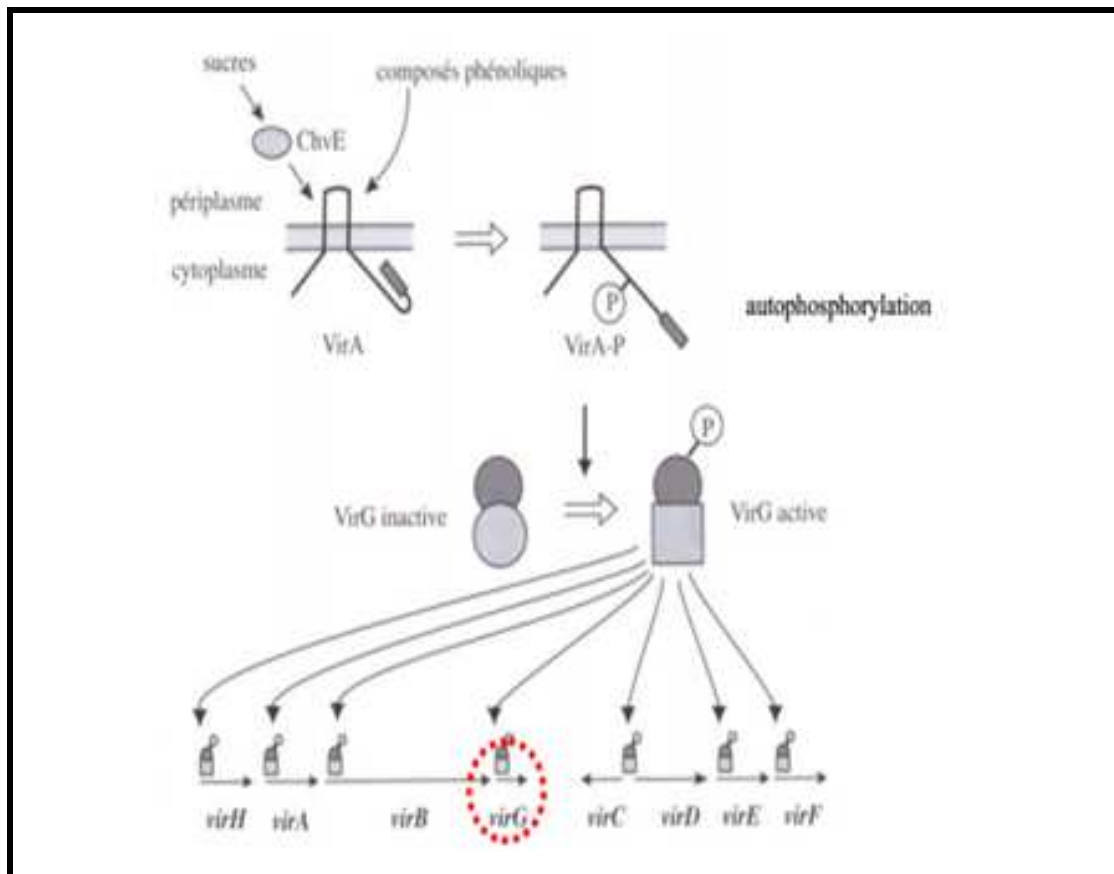


Figure 11 : Modèle d'activation des gènes de virulence d'*Agrobacterium tumefaciens* (Franche, 2013).

c. Transfert de l'ADN-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 et 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 (**Figure 12**).

La transgénèse végétale

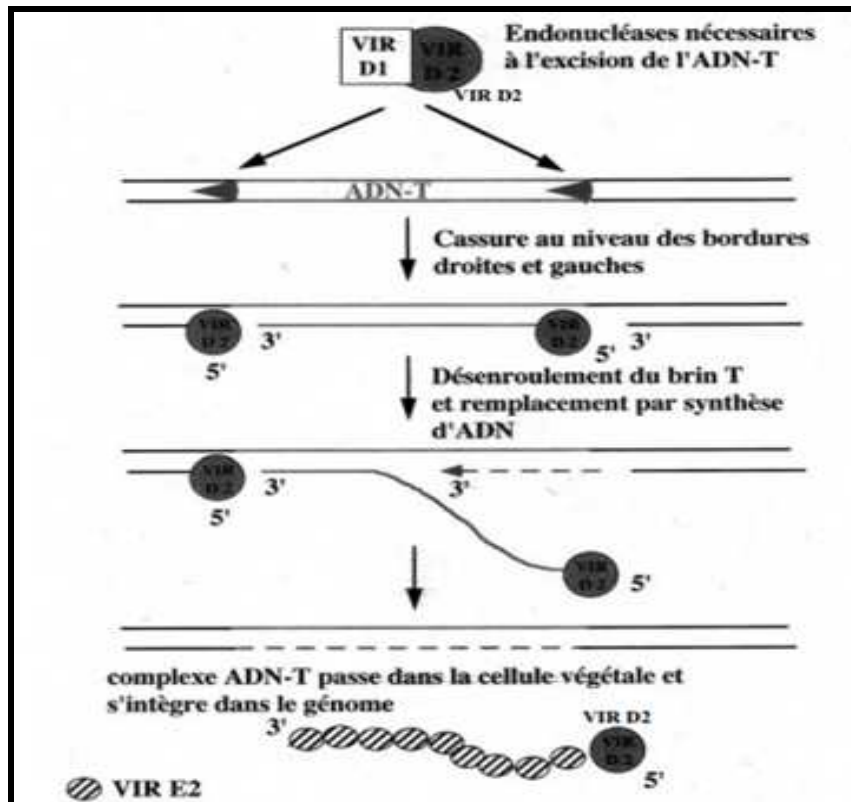


Figure 12 : Modèle de synthèse de l'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens* (Crété, 2006).

d. Translocation du brin T dans la cellule végétale et son intégration dans le génome de l'hôte

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, il s'agit de l'intervention de 12 protéines : 11 protéines VirB et de la protéine VirD4. 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.

Le **tableau 3** et la **figure 13** nous résument les étapes du processus d'infection d'*Agrobacterium tumefaciens* avec la plante hôte et les différents gènes nécessaires qui y interviennent.

La transgénèse végétale

Tableau 03 : Etapes de l'interaction *Agrobacterium tumefaciens*/plante hôte et intervention des différentes protéines (Franche, 2013).

Etape	Caractéristique spécifique de l'interaction	Protéines impliquées
Reconnaissance cellule/cellule	Attachement d' <i>Agrobacterium</i> aux cellules végétales blessées	ChvA, ChvB, PscA, Att
Transduction des signaux	Reconnaissance des signaux de la plante et activation du système de transfert de l'ADN-T	ChvE, VirA, VirG
Activation transcriptionnelle	Phosphorylation de l'activateur transcriptionnel et expression des gènes <i>vir</i>	VirG
Formation du brin-T	Coupe sur les bordures de l'ADN-T et mobilisation d'un complexe ADN-T simple brin/protéines	VirD1, VirD2, VirC1
Transport intercellulaire	Formation d'un pore transmembranaire qui permet le passage du complexe T dans le cytoplasme de la cellule végétale hôte	VirE2, VirE1, VirD2, VirD4, protéines VirB
Transport dans le noyau	Interaction avec les récepteurs SLN de la cellule hôte et passage du complexe T à travers le pore nucléaire	VirD2, VirE2
Intégration	Intégration de l'ADN-T dans le génome végétal et synthèse du second brin de l'ADN-T	(VirD2, VirE2)

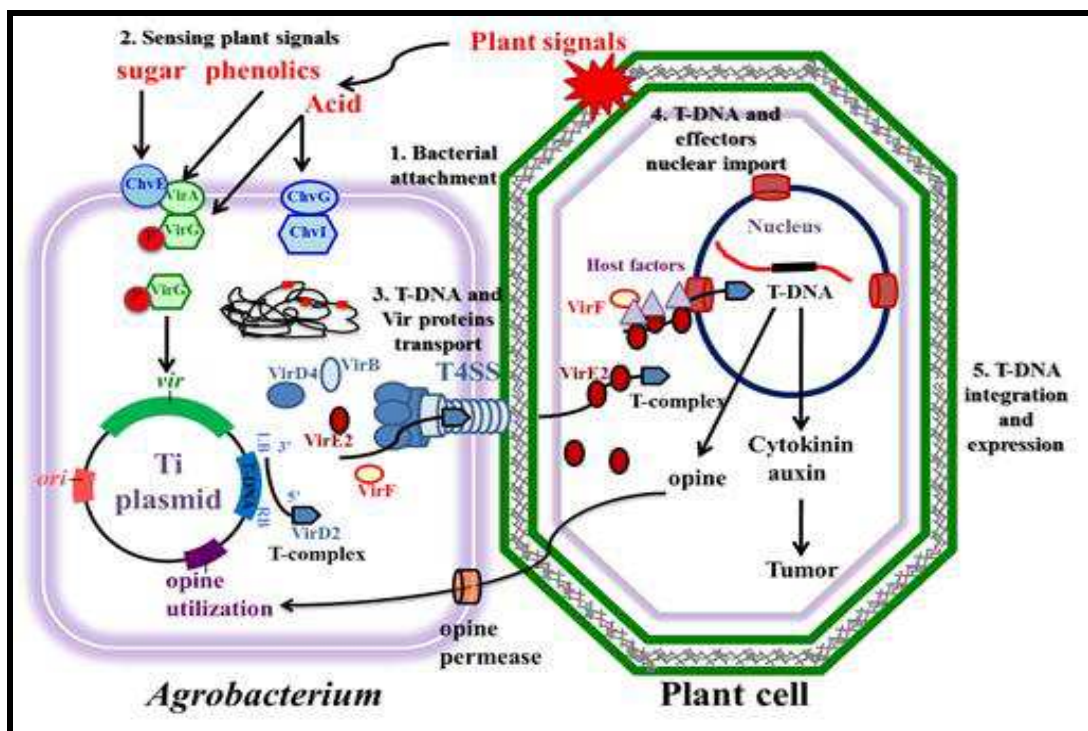


Figure 13 : Etapes de l'infection de la plante par *Agrobacterium tumefaciens* (Hwang *et al.*, 2017).

La transgénèse végétale

2. *Agrobacterium rhizogenes*

2.1. Formation des chevelus racinaires (*hairy roots*)

En 1930, des études ont montré que la bactérie *Agrobacterium rhizogenes* était responsable de la maladie du chevelu racinaire ou « *hairy root* » qui provoque la différenciation de chevelus racinaires caractéristiques, au niveau de sites d'infection. Les tissus ainsi formés (chevelus racinaires) sont les conséquences de la transformation génétique de cellules normales en cellules à prolifération active. Ces tissus peuvent être cultivés *in vitro* en l'absence de la bactérie et possèdent deux caractéristiques (**Figure 14**) : la première est qu'ils peuvent se développer en l'absence de facteurs de croissance exogènes car les cellules qui les constituent ont acquis le pouvoir de synthétiser leurs propres phytohormones (auxines et cytokinines), la seconde caractéristique est qu'ils produisent et excrètent des dérivés d'acides aminés particuliers appelés opines qui sont spécifiques de la souche bactérienne inductrice, qui les utilise comme source de carbone. Ces racines se différencient des racines normales par leurs nombreuses ramifications latérales et leur agéotropisme (**Figure 15**). Il en résulte une biomasse importante en un temps relativement court.

Chez de nombreuses espèces de plantes, il est possible d'induire une régénération du végétal à partir de ces racines, avec un phénotype caractérisé le plus souvent par des feuilles gaufrées, des internœuds plus courts et une dominance apicale réduite. Toutes les cellules d'une racine de *hairy root* dérivent d'une cellule d'un méristème transformée et constituent un clone, contrairement à celles de la tumeur de *crown gall* qui est une chimère, mélange de cellules transformées et de cellules normales.

Les propriétés des racines transformées ont suscité l'intérêt des chercheurs sur de nombreux aspects. Les axes de recherche développés vont de l'étude de la composition et de la biologie des racines à leur utilisation pour développer des caractères agronomiques particuliers. La possibilité de les cryoconserver en fait un outil particulièrement intéressant pour des applications tant en recherche qu'en industrie. L'amélioration des rendements de production en métabolites. De nombreux métabolites d'intérêt tels que des alcaloïdes, terpènes, et composés phénoliques sont naturellement produits dans les racines transformées de différentes espèces.

La transgénèse végétale

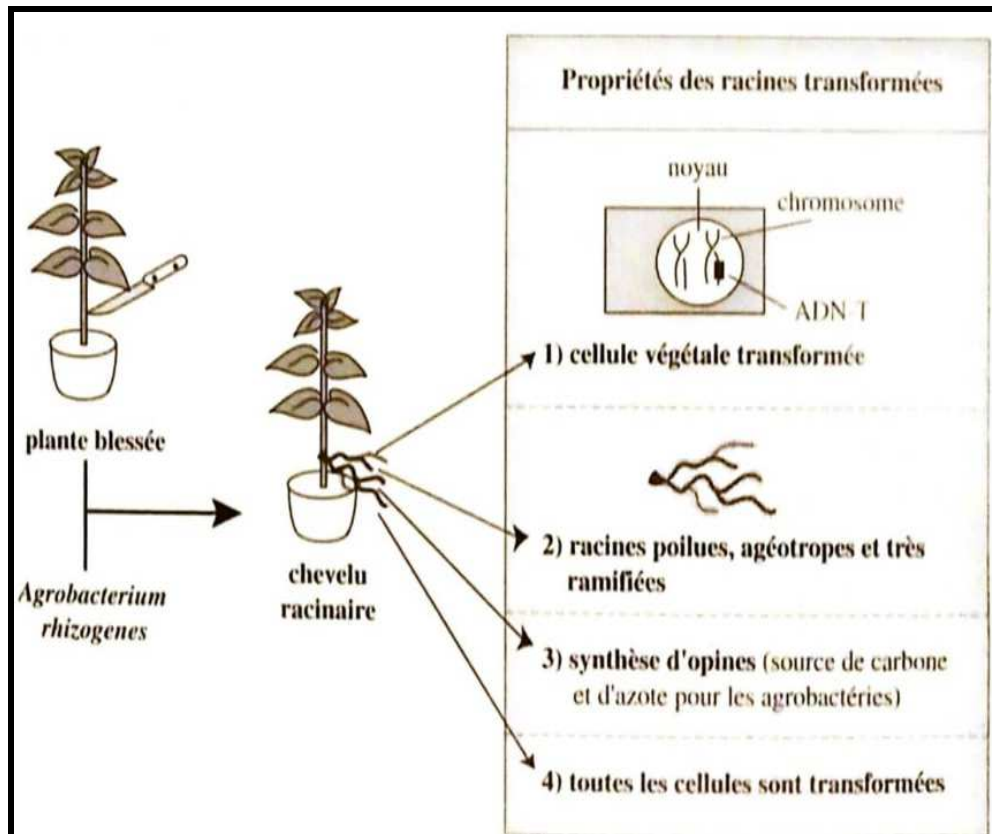


Figure 14 : Propriétés des chevelus racinaires (Franche et Duhoux, 2001).



Figure 15 : Chevelus racinaires induits par *Agrobacterium rhizogenes* chez l'arachide (Guimaraes *et al.*, 2017).

La transgénèse végétale

2.2. Organisation du plasmide Ri (pRi : *Root inducing*)

Le principal élément pathogène de la bactérie *Agrobacterium rhizogenes* est un plasmide de haut poids moléculaire (~ 200 kb), appelé plasmide Ri (pRi : *Root-inducing*). Le nom donné au plasmide reflète le symptôme de la maladie : apparition d'un important chevelu racinaire au point d'infection avec *A. rhizogenes*.

Le plasmide Ri comporte : une origine de réplication (*ori*), la région d'incompatibilité (*inc*), les gènes de transfert conjugatif (*tra*), les gènes responsables du catabolisme des opines (*opc*), les gènes de virulence (*vir*), et la région T qui est délimitée par des frontières gauche et droite (LB et RB). Cette dernière comporte différentes parties : les gènes *rol A*, *B*, *C* et *D*, qui sont des facteurs de croissance et de différenciation des cellules, les gènes *iaaM* et *iaaH* qui sont responsables de la synthèse d'auxines et qui modifient ainsi la balance hormonale de la plante pour induire la formation de racines, et les gènes *mas1*, *mas2* et *ags*, responsables de la synthèse d'opines par la plante, qui seront ensuite utilisées comme source de nutriments par la bactérie (Figure 16).

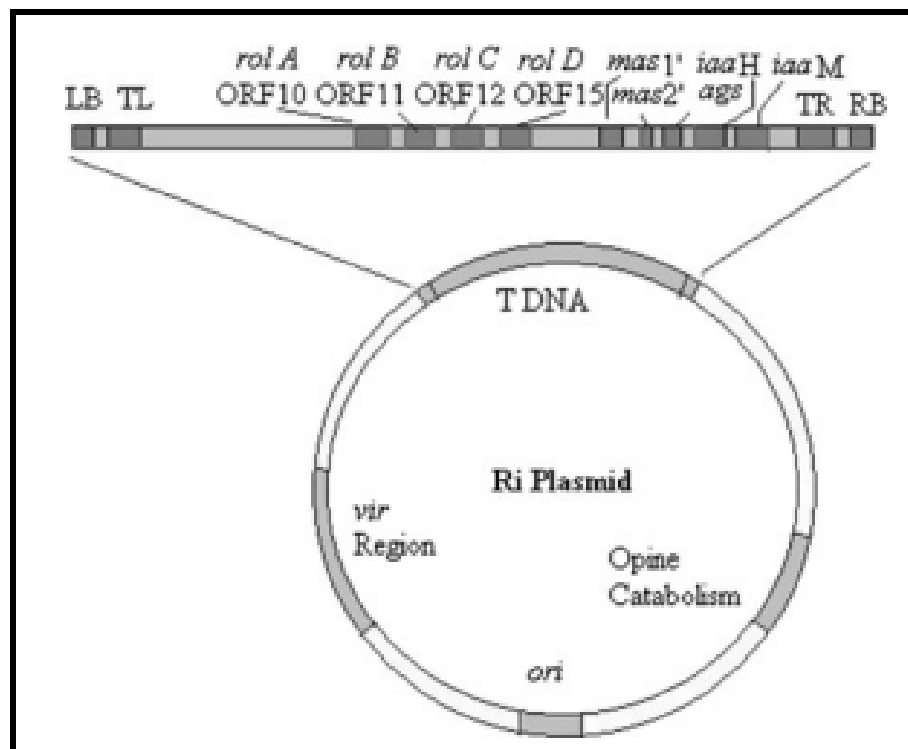


Figure 16 : Représentation schématique du plasmide Ri d'*Agrobacterium rhizogenes* (Guimaraes *et al.*, 20017).

La transgénèse végétale

2.3. Processus d'infection

Dans la nature, le *hairy root* a été observé sur un nombre limité d'espèces de plantes : le pommier, le concombre, et le melon. La biologie générale du processus d'infection semble être similaire à celle d'*A. tumefaciens*. Les études du processus de transfert de l'ADN-T ont porté principalement sur *A. tumefaciens*, et c'est donc ce micro-organisme qui est le mieux connu.

IV. Méthodes directes de transfert de gènes chez les plantes

Parallèlement aux recherches menées sur *Agrobacterium*, se sont développées, à l'origine essentiellement sur cellules animales, des techniques de transfert direct d'ADN, par des méthodes chimiques, physiques ou faisant appel à des impulsions électriques. Les cellules issues de différents types de tissus végétaux peuvent être soumises à la transformation. Selon les espèces, ce seront des disques foliaires, des sections de tige, des cotylédons, des embryons, des microspores ou des protoplastes. On utilise le plus fréquemment des disques foliaires comme pour le tabac ou la tomate.

1. Transfert dans les protoplastes

Les protoplastes constituent un matériel privilégié pour le transfert direct de gènes. Débarrassées de leur paroi pectocellulosique (**Figure 17**), ils ne présentent plus d'obstacle à l'intégration de l'ADN. Pour provoquer une perméabilisation temporaire et réversible de la membrane plasmique des protoplastes en culture avec l'ADN, on procède à des modifications des conditions physico-chimiques du milieu. Les molécules d'ADN pénètrent ainsi dans les protoplastes et certaines d'entre elles s'intègrent à l'ADN du noyau. Dans ce cas, le protoplaste est transformé.

C'est grâce à ces techniques sur la transformation des protoplastes que des céréales de grande culture, monocotylédones, telles que le riz, le maïs ou l'orge ont été transformées pour la première fois. Effectivement, ces plantes étaient réputées insensibles à *Agrobacterium*. De plus, cette méthode est relativement facile à mettre en œuvre, mais suppose toutefois la possibilité de régénérer des plantes à partir de protoplastes, ce qui limite leur emploi chez les espèces récalcitrantes.

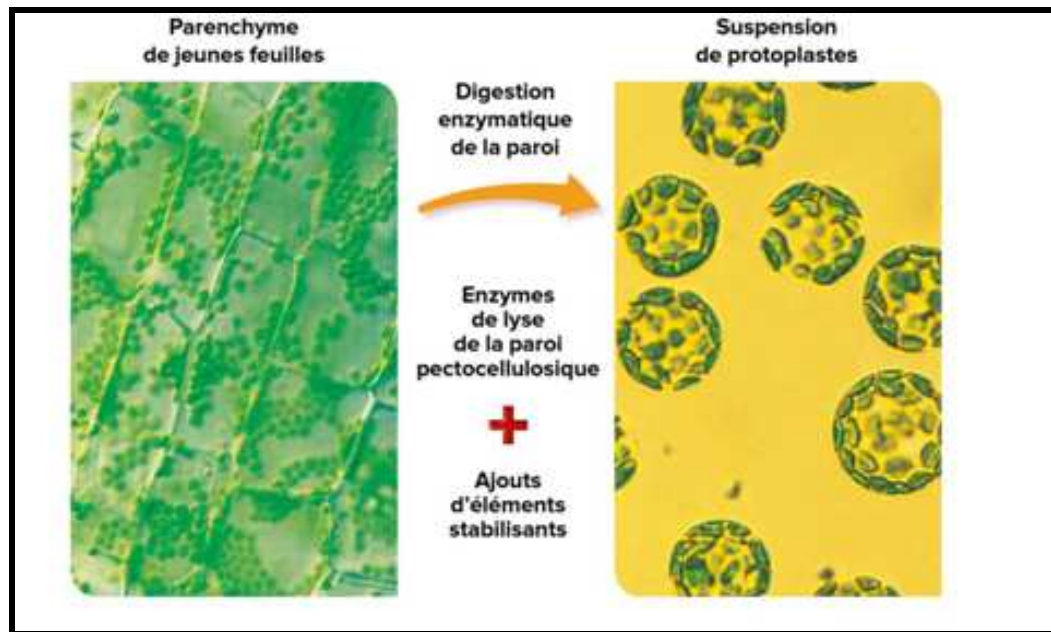


Figure 17 : L'obtention de protoplastes (gnis-pedagogie, s.d.).

Les techniques de transfert direct nécessitent également une étape de sélection des cellules transformées. Trois techniques permettent d'introduire l'ADN dans les protoplastes :

1.1. Méthode chimique : utilisation du PEG

Première méthode historique (1982) qui consiste à utiliser le polyéthyléneglycol (PEG), 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 un herbicide, le glufosinate. Elle est également utilisée pour la betterave.

1.2. Lipotransfection

Il s'agit d'une technique physique qui consiste à encapsuler l'ADN dans des petites vésicules sphériques artificielles de phospholipides appelées liposomes. Ces liposomes fusionnent avec la membrane des protoplastes et libèrent leur contenu dans le cytoplasme du protoplaste des cellules végétales. Cependant, seulement une minorité de ces gènes pourront parvenir jusqu'au noyau et s'intégrer par la suite au génome de la cellule, c'est pourquoi cette méthode est peu utilisée.

La transgénèse végétale

1.3. Electroporation

Cette méthode, efficace et l'une des plus simples à mettre en œuvre, fait appel à des impulsions électriques. Elle consiste à soumettre un mélange de protoplastes et d'ADN à une série de chocs électriques de courte durée et de tension élevée. Le champ électrique provoque la déstabilisation de la membrane plasmique par polarisation des phospholipides qui la constituent et induit alors la formation de pores au travers desquels les molécules d'ADN peuvent transiter. Si le choc électrique n'a pas été trop violent, le phénomène est réversible et la membrane reprend ensuite son état initial, laissant le protoplaste parfaitement viable (**Figure 18**).

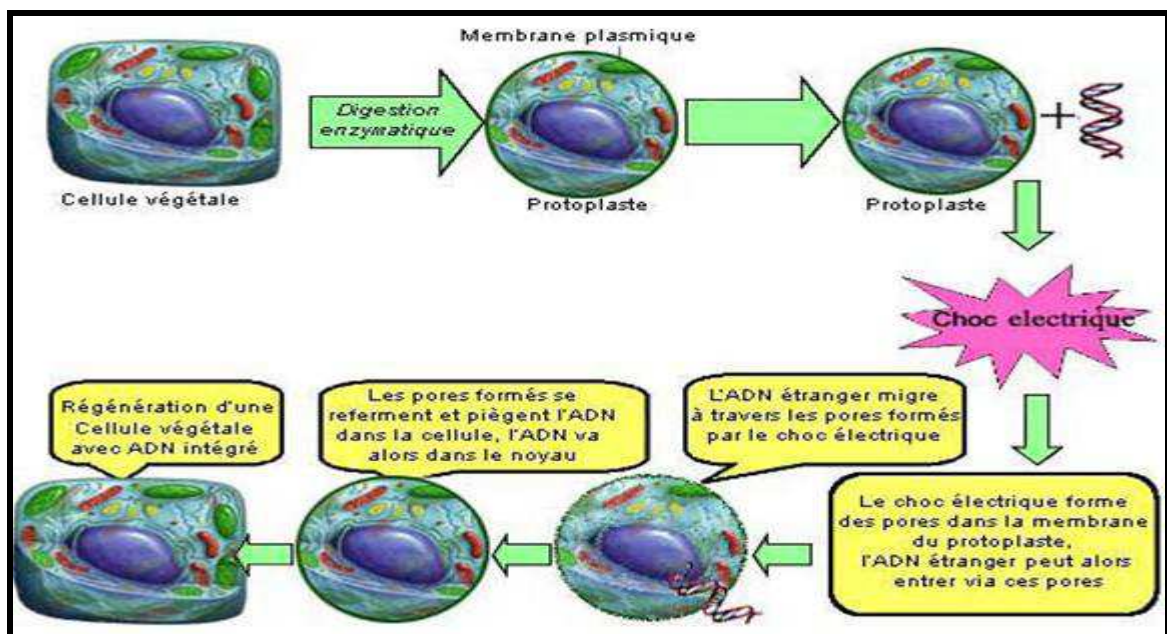


Figure 18 : L'électroporation des protoplastes (Chimie-Sup, 2015).

La **figure 19** nous montre les différentes étapes de la transformation génétique du riz par électroporation de protoplaste, ou la construction chimérique contient un gène de sélection qui est l'hygomycine phosphotransferase. Dix jours après, ils sont mis en présence d'hygromicine. Trois semaines plus tard, des microcals résistants à l'antibiotique sont visibles (1 à 2 mm de diamètre). Ils sont alors transférés sur un milieu de régénération dépourvu d'antibiotique. Deux mois après ce transfert, des plantules peuvent être régénérées sur 60 à 80 % des cals résistants à l'hygromicine.

La transgénèse végétale

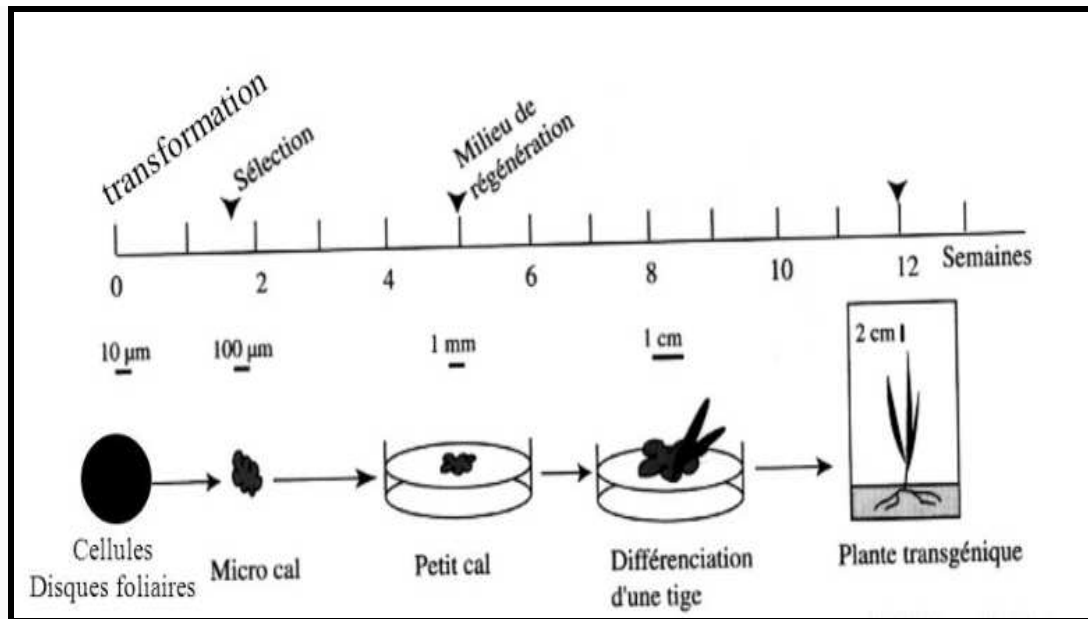


Figure 19 : Les différentes étapes de la transformation génétique par électroporation de protoplastes de riz (Franche et Duhoux, 2001).

1.4. Micro-injection

La micro-injection est une autre technique pour fabriquer un OGM. C'est l'introduction de petites quantités d'un matériel généralement liquide, comme l'ADN, l'ARN, les enzymes, dans un tissu biologique qui est défini. Elle se réalise sur des protoplastes, dont nous avons vu précédemment la formation. L'opération consiste à introduire directement le gène étranger dans la cellule à modifier, à l'aide d'un micromanipulateur monté avec un microscope. On maintient le protoplaste à transformer avec une micro-aiguille et on introduit la construction génique dans le noyau, à l'aide d'une micro-pipette. La cellule est alors génétiquement modifiée (**Figure 20**).

Après l'injection, le protoplaste est libéré et mis en culture sur un milieu approprié jusqu'à obtention d'un cal et régénération de plantes transgéniques. Cependant cette méthode ne s'applique que dans des cas particuliers car elle est complexe et lourde à utiliser : pour réussir l'opération, il faut injecter mille copies du gène dans l'espoir qu'une cellule puisse accepter cet ADN étranger.

La transgénèse végétale

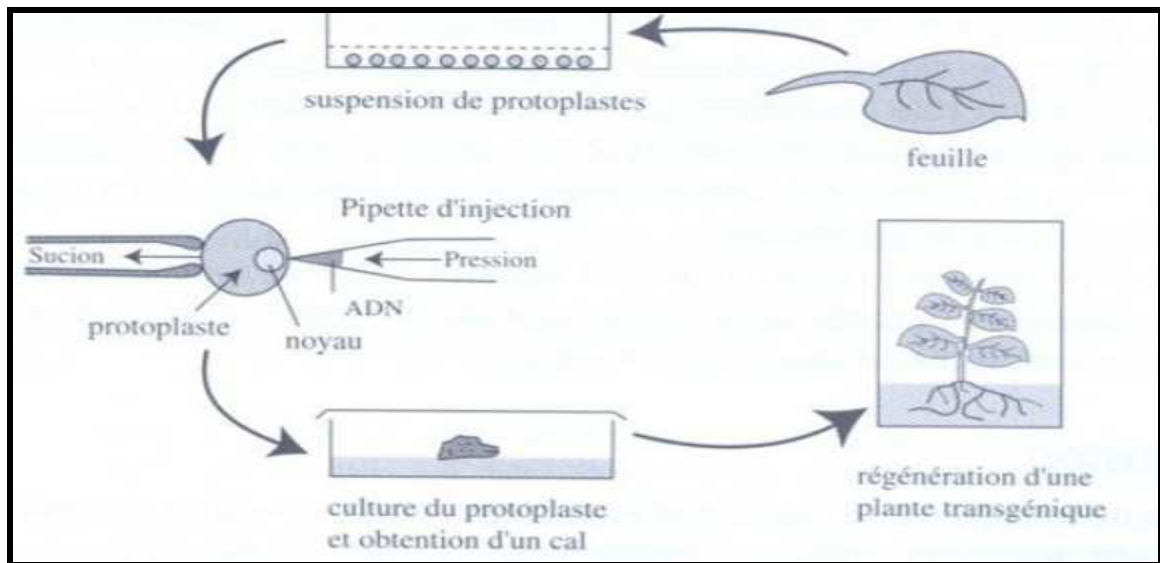


Figure 20 : La transgénèse par micro-injection (Perrin, 2016).

2. Biolistique

Il s'agit, dans ces différents cas de palier aux limites de la transformation de protoplastes pour les espèces dont on ne maîtrise pas la régénération des plantes en culture *in vitro*. Cette technique est applicable à une large variété de tissus, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*.

Le principe consiste à forcer la pénétration de l'ADN à travers la paroi pectocellulosique des cellules végétales en utilisant un canon à particules en projetant sur le tissu à transformer de toute petites billes, de 1 à 3 μm de diamètre, d'or ou de tungstène enrobés d'ADN. La force de propulsion est obtenue par détente d'un gaz sous pression (l'hélium le plus souvent) (**Figure 21**). Ces billes projetées ont suffisamment d'énergie cinétique pour traverser la paroi et la membrane des cellules sans leur infliger de dommages irréparables. On peut ainsi introduire de l'ADN dans des tissus qui vont directement générer une plante comme des embryons ou des méristèmes. Il faudra quinze jours environ pour s'assurer que ces nouveaux gènes ont bien été introduits dans le génome de l'organisme.

Cette méthode est facile d'emploi et permet d'obtenir des 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. Cette méthode peut parfois engendrer l'insertion de nombreuses copies du gène d'intérêt. Il faut donc trier les plantules obtenues par analyse moléculaire.

La transgénèse végétale

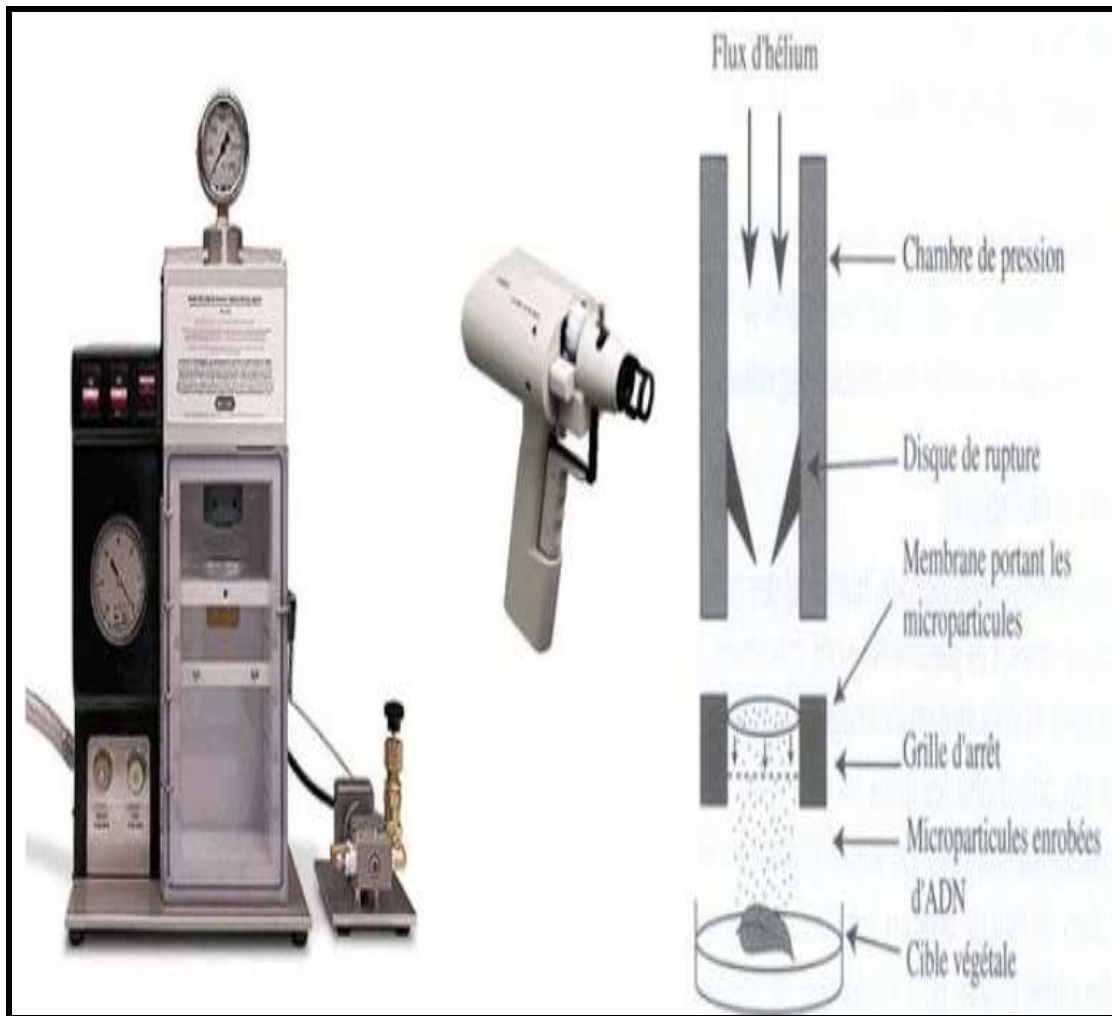


Figure 21 : La transgénèse par canon à particule (Perrin, 2016).

La transfection biolistique a également de nombreux avantages comparativement aux autres techniques de transfection : -cette méthode efficace et très prometteuse, elle permet de façon simple et rapide d'injecter de l'ADN dans une grande quantité de cellules sans passer par une phase protoplasique, encore très mal maîtrisée chez certaines espèces, - l'injection peut être réalisée sur un tissu non désolidarisé de l'organe d'origine, - l'utilisation d'un canon à ADN ne requiert aucunement l'insertion précise d'ADN dans les cellules, - opération d'une grande difficulté nécessitant précision et lenteur, - un coût bien plus faible et une toxicité cellulaire bien moindre que pour la lipotransfection, - une spécificité et un taux de mortalité inférieurs, ainsi qu'une facilité de préparation des cellules, supérieure à l'électroporation. Bien que le coût des consommables utilisés par la machine soit relativement faible, l'inconvénient majeur est cependant le prix du canon à ADN.

La transgénèse végétale

3. Agrobiolistique

L'agrobiolistique est une technique qui combine la biolistique avec le transfert direct par *Agrobacterium*. Cette dernière est utilisée quand une seule technique est peu efficace. Les microbilles provoquent simplement des micro-blessures dans les cellules qui sont ensuite soumises aux agrobacteries possédant le gène à transférer. Ces micro-blessures facilitent l'envahissement des tissus par les agrobactéries et augmente le rendement de transformation (**Figure 22**).

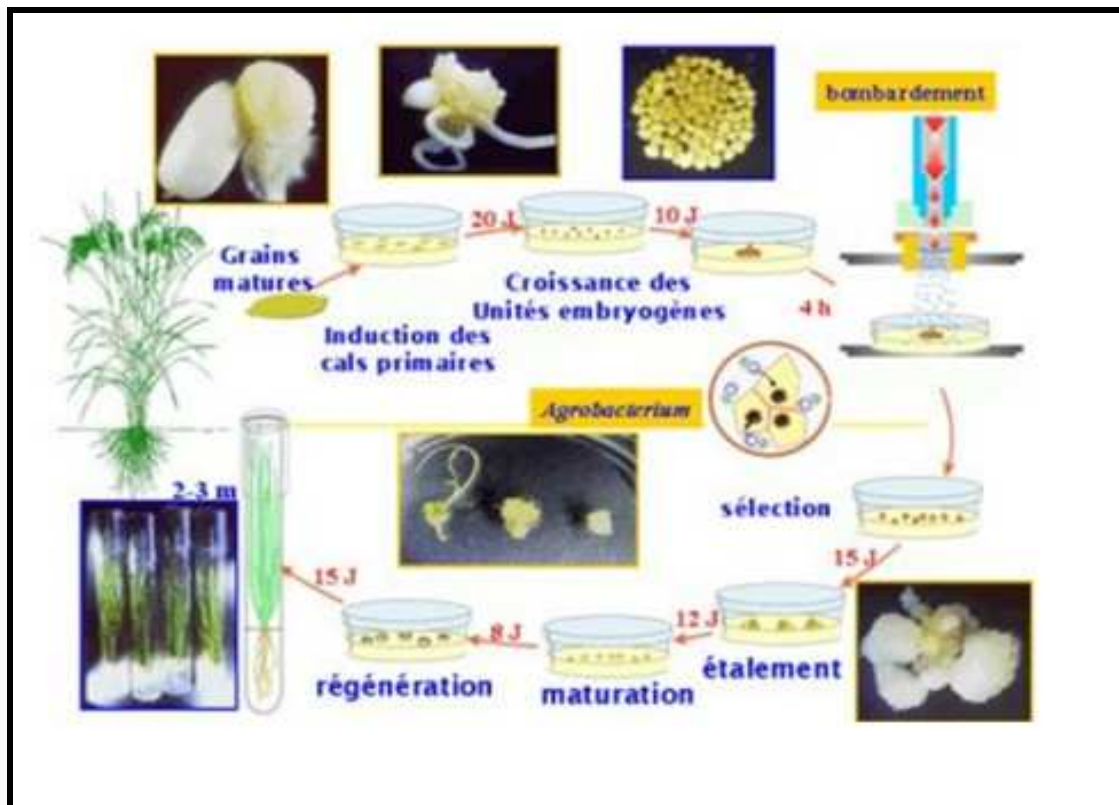


Figure 22 : La transgénèse par agrobiolistique (Perrin, 2016).

D'autres techniques de transfert direct sont en cours d'étude : la transformation du pollen, la sonication de tissus, la macro-injection d'ADN dans les tissus conducteurs ou encore l'imbibition d'embryons et même des systèmes de fibres carbonées où l'ADN est adsorbé, sont en cours d'étude. On sait maintenant réaliser la transformation d'organites (comme les chloroplastes) et utiliser des virus comme vecteur. A l'heure actuelle, on peut considérer que la plupart des plantes de grande culture (soja, maïs, blé, riz, coton, tournesol, pomme de terre, colza, tomate) sont accessibles à la transformation génétique.

La transgénèse végétale

Le système de transfert direct idéal doit être simple, applicable à toutes les espèces végétales, efficace et peu coûteux. Comme nous l'avons indiqué précédemment, nombreuses techniques permettent désormais d'introduire de l'ADN dans les plantes ; ces techniques conduisent à l'expression transitoire de transgènes et éventuellement, à la régénération de plantes fertiles transformées de façon stable. Les plus efficaces sont sans nul doute le bombardement par des microprojectiles accélérés à grande vitesse et la transformation de protoplastes. Aucune n'est toutefois idéale, comme l'indique le **tableau 04** qui résume les avantages et les inconvénients des différentes approches citées dans ce chapitre. De nouveaux progrès seront à attendre lorsque des recherches seront entreprises pour comprendre au niveau fondamental les processus de transfert et d'intégration de l'ADN exogène sans le noyau des cellules hôtes.

Tableau 04 : Evaluation des différentes techniques de transfert direct de gènes pour la transformation stable des cellules végétales (Franche et Duhoux, 2001).

Technique	Efficacité de transformation ¹	Toxicité pour les cellules	Complexité technique ²
Protoplastes	+++	+	+
Biolistique	+++	+	+++
Électroporation (tissus)	(+)	++	+
Électrophorèse	-	+++	-
Sonication	(+)	++	-
Fibres	+	+	-
Laser	(+)	++	++++
Micro-injection	(+)	++	++++
Macro-injection	-	++	-
Imbibition	e	-	-

La transgénèse végétale

V. Vecteurs de transformation

1. Vecteurs dérivés du plasmide pTi d'*Agrobacterium tumefaciens*

La capacité d'*Agrobacterium* de transférer une partie de son ADN offre la possibilité d'introduire des gènes à caractères agronomiques chez les plantes cultivées. L'idée était d'utiliser le plasmide pTi comme vecteur de gènes, tout en conservant les gènes essentiels au transfert et à l'intégration de l'ADN-T (région vir) mais, en éliminant la région des oncogènes, on obtient alors des plasmides dits désarmés (**Figure 23**).

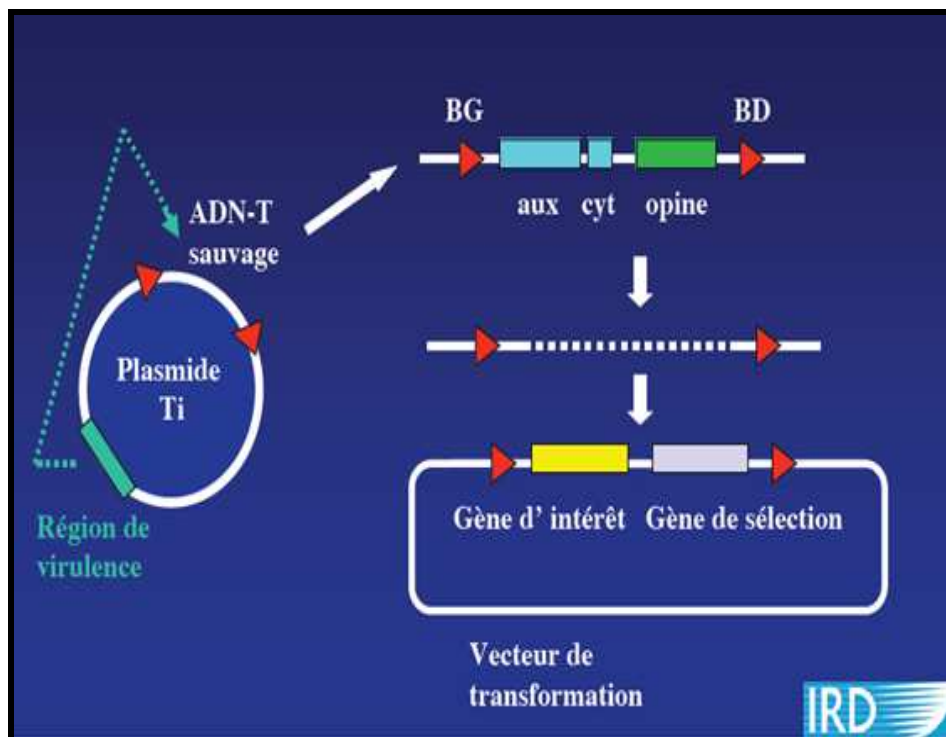


Figure 23 : Souche désarmée d'*Agrobacterium tumefaciens* (Franche, 2013).

Ainsi, fut établi un système de co-intégrat où l'ADN étranger est cloné sur l'ADN-T d'un plasmide Ti débarrassé de ses oncogènes. Mais vu la grande taille des plasmides Ti qui rend leur manipulation délicate, un deuxième système fut créé : le système binaire où l'ADN étranger est cloné dans un petit plasmide facilement manipulable au niveau d'un mini ADN-T comprenant les deux séquences de bordure et un gène codant pour un caractère de sélection. Le transfert du mini ADN-T portant le gène étranger est réalisé en trans par la région vir d'un plasmide Ti ou adjacents.

La transgénèse végétale

1.1. 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 *Escherichia coli* est utilisé pour faciliter le transfert du transgène. Les séquences bordures, 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 réplication 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 choisies 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 réplication différentes et peut, par conséquent, être utilisé pour transférer des gènes d'un hôte à autre (**Figure 24**).

1.2. 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* 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 transfert) et mob (pour mobilisation) codant pour les protéines tra et mob. C'est une conjugaison triparentale. Le plasmide helper ne possédant pas d'origine de réplication d'*Agrobacterium*, est éliminé au cours des divisions successives.

La transgénèse végétale

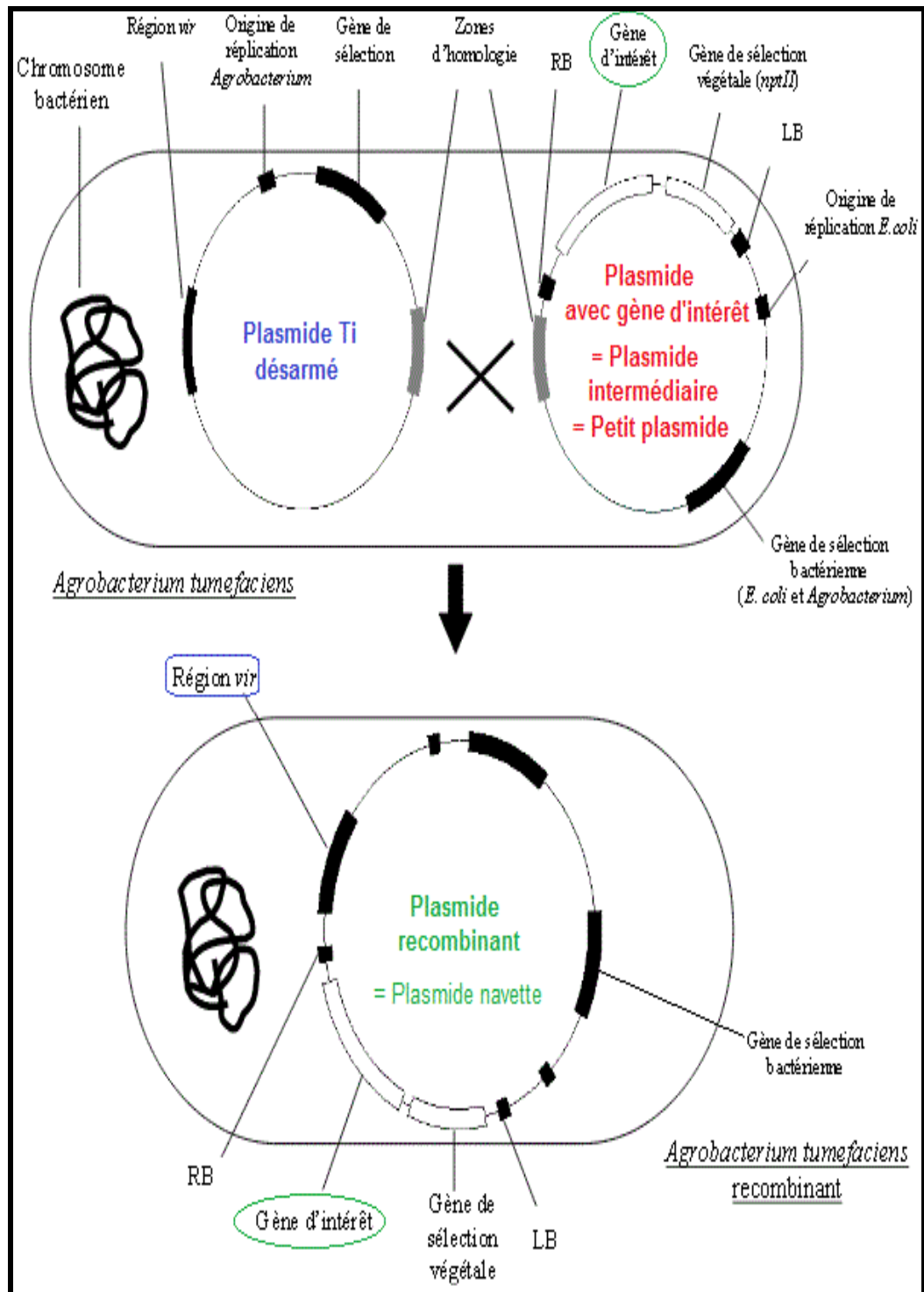


Figure 24 : Vecteurs de transformation co-intégrés (biotech-ecolo, s.d.).

La transgénèse végétale

La recombinaison permet d'ajouter 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 *A. tumefaciens*. Les bactéries réceptrices sont sélectionnées grâce au gène de sélection bactérien (AmpR par exemple). Le plasmide Ti désarmé d'*A. tumefaciens* induira grâce à son gène de virulence, le transfert de l'ADN-T recombiné dans l'autre plasmide (petit plasmide) (**Figure 25**).

2. Vecteurs de transfert direct

Les premières expériences de transfert dans des protoplastes ont été réalisées avec des plasmides Ti purifiés. Toutefois, ces vecteurs se prêtent mal aux exigences des techniques de transfert direct. Le plasmide Ti possède en effet une masse moléculaire élevée et est présent en faible nombre de copies dans les bactéries, ce qui limite l'efficacité des clonages et la quantité de plasmide purifié à partir des cultures bactériennes ; en outre, la présence des bordures de l'ADN-T n'est pas nécessaire en l'absence des protéines de virulence.

On préfère donc utiliser des petits plasmides multicopies de type pUC qui possèdent une masse moléculaire initiale d'environ 2,7 kb. Le site multiple de clonage présent dans le vecteur permet l'insertion des gènes d'intérêt et de sélection choisis. Les vecteurs obtenus sont amplifiés chez *E. coli*, puis purifiés en grande quantité, et enfin introduits dans les cellules végétales en utilisant l'une des techniques de transfert direct décrites précédemment.

3. Séquences d'ADN introduites dans le génome végétal

Les séquences que l'on désire introduire dans le génome végétal sont alors substituées aux oncogènes. Ces portions d'ADN peuvent être de trois types :

3.1. Promoteurs et activateurs transcriptionnels

Les promoteurs régularisent le niveau d'expression du gène en spécifiant le nombre d'ARNm qui doit être transcrit pour un gène donné. La séquence d'ADN de la région promoteur interagit avec les protéines du facteur de transcription qui permettent de faire appel à la machine cellulaire requise pour transcrire l'ARN. La transcription est faite par un enzyme, l'ARN polymérase.

La transgénèse végétale

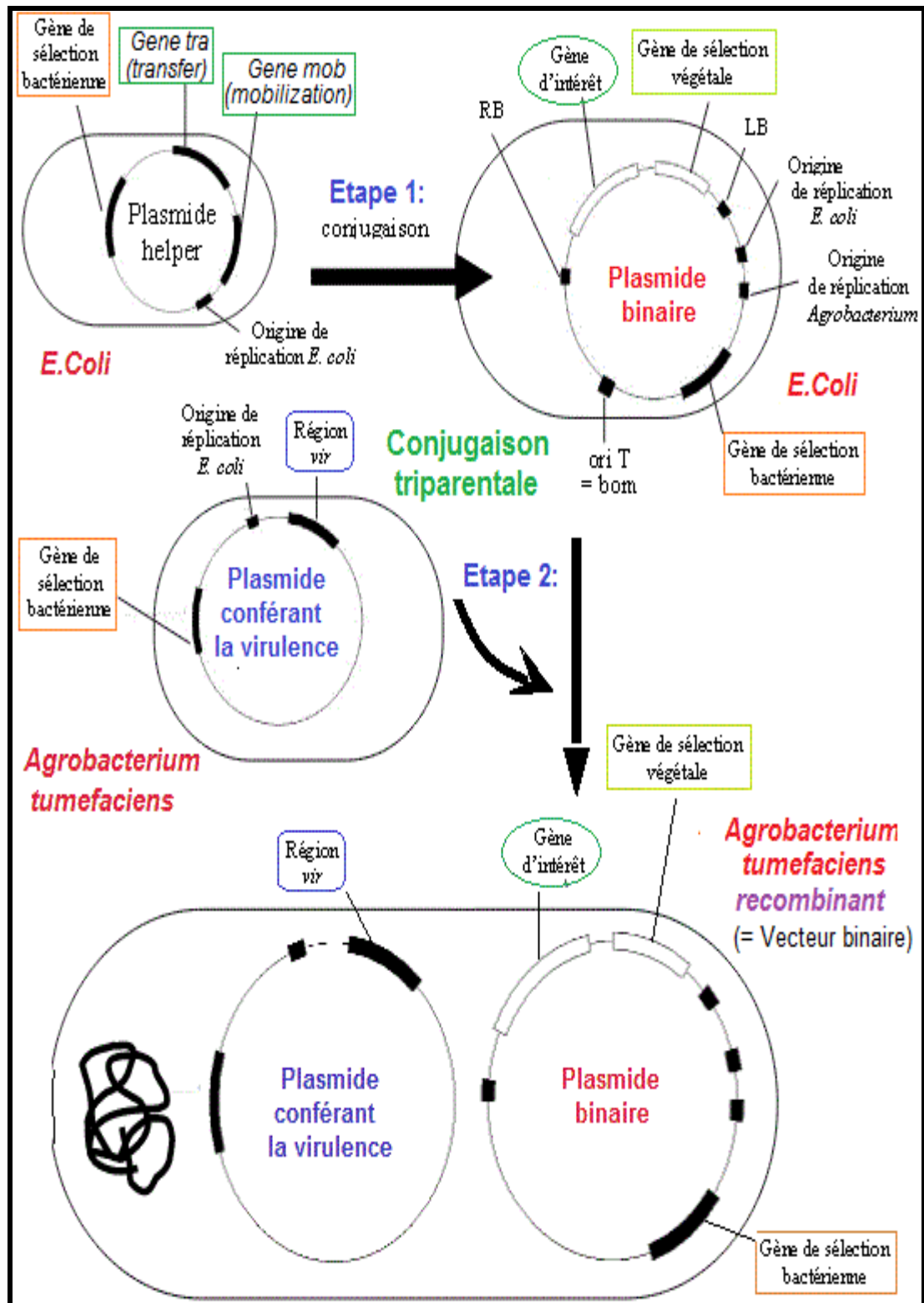


Figure 25 : Vecteurs de transformation binaire (biotech-ecolo, s.d.).

La transgénèse végétale

La transcription de l'ARN correspondant est transformée en ARNm et ensuite traduit en protéine. Le nombre d'ARNm produit est un facteur de base dans la détermination du volume de protéine synthétisée ce qui influence la détermination du niveau d'expression du gène. Les facteurs liés aux promoteurs réagissent à des signaux en provenance de l'organisme ou/et de l'environnement ambiant. La source et le type de signal détermine le type de promoteurs qui sera activé. En génie génétique, il existe trois types de promoteurs principaux qui sont utilisés selon le niveau d'expression du gène et de la spécificité requis :

a. Promoteurs constitutifs

Des promoteurs constitutifs permettent l'expression du gène dans tous les tissus sans tenir compte de l'environnement ambiant ni du niveau de développement de l'organisme. Ces promoteurs peuvent activer en tout temps, le gène dans toutes les cellules vivantes de l'organisme durant toute la vie de l'organisme. Ces promoteurs peuvent être souvent utilisés pour toutes les espèces.

Les promoteurs constitutifs les plus couramment utilisés pour les plantes incluent entre autres le promoteur du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) 35S, les promoteurs des opines, l'ubiquitine végétale (Ubi), l'actine-1 du riz (Act-1) et l'alcool déshydrogénase 1 du maïs (Adh-1). L'Ubi du maïs et l'Actine-1 du riz sont actuellement les promoteurs constitutifs les plus utilisés pour les monocotylédones. Le promoteur nos, quant à lui, il code la nopaline synthase isolé de l'ADN-T des agrobactéries. Ce dernier dirige l'expression des gènes d'opines et ne confère pas toujours un fort niveau d'expression.

✓ Promoteur 35S

Le promoteur CaMV 35S est celui du virus de la mosaïque du chou-fleur (découvert dans les années 1980) responsable de la décoloration du limbe entre les nervures des feuilles de Brassicacées. Il s'agit d'un promoteur constitutif fort, couramment utilisé c'est le promoteur le plus utilisé pour diriger l'expression des transgénèse dans les plantes transgéniques. Il entraîne des niveaux d'expression élevés chez les dicotylédones et moins efficace chez les monocotylédones (céréales), mais il a toutefois permis la sélection de cals transformés de blé, riz, seigle maïs. Ce promoteur n'est pas actif à tous les stades de développement et constitue un marqueur moléculaire de l'embryogenèse. Des

La transgénèse végétale

expériences de délétion ont été réalisées afin de déterminer les régions responsables de l'activité du promoteur 35S (**Figure 26**).

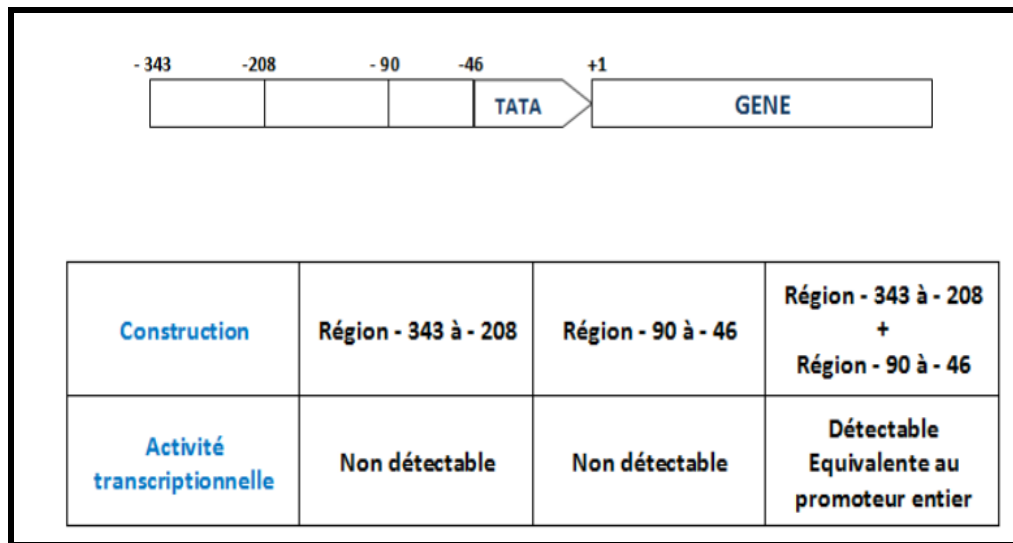


Figure 26 : Constitution du promoteur 35S (Conan *et al.*, 2011.).

b. Promoteurs spécifiques

Avec le clonage et la caractérisation d'un nombre de plus en plus important de gènes végétaux, on dispose désormais d'une grande panoplie de promoteurs présentant des spécificités d'expression particulières. Avec les premières plantes transgéniques d'intérêt commercial, on cherchait à atteindre au niveau d'expression constitutif des transgènes ; désormais, pour protéger l'environnement, on préfère limiter leur expression à certains organes ou tissus.

Les promoteurs spécifiques aux tissus ou à l'étape de croissance permettent l'expression d'un gène dans un/des tissu(s) spécifique(s) ou à des étapes de croissance spécifiques sans modifier le reste de l'organisme. Dans le cas des végétaux, ces promoteurs pourraient influencer spécifiquement l'expression des gènes des racines, des fruits ou des semences ou durant les périodes végétatives, l'expression des gènes de floraison ou de croissance des semences. Si le sélectionneur voudrait qu'un gène d'intérêt s'exprime dans différents types de tissu, par exemple dans la racine, l'anthère et le sac ovigère, alors il devrait inclure des promoteurs multiples spécifiques de tissus dans la composition du gène.

La transgénèse végétale

c. Promoteurs inductibles

Ce sont des promoteurs qui répondent à des inducteurs spécifiques comme pour les promoteurs inductibles à la blessure, qui ne provoqueront l'expression des gènes de résistance que lors d'une attaque par les insectes. Ces promoteurs sont extrêmement utilisés lorsque le transgène code une protéine létale pour la cellule végétale, ou lorsque l'on souhaite éteindre par des stratégies antisens des gènes ayant une fonction physiologique indispensable à la survie de la plante.

3.2. Gènes de sélection

Les gènes de sélection confèrent une résistance à des agents chimiques, comme des antibiotiques (**Tableau 04**) ou des herbicides. Le taux de transformation des plantes est généralement très faible, c'est pourquoi des marqueurs de sélection sont utilisés pour assurer le suivi des cellules transformées sur un milieu sélectif et inhiber la régénération de cellules non transformées. Une plante transformée avec un gène permettant de métaboliser un composé confère une résistance, ou une capacité à utiliser ce composé, supérieure à celle d'une plante témoin non transformée. Néanmoins, certaines plantes non transformées peuvent résister à la sélection parce que présentant une résistance intrinsèque leur permettant de supporter la dose de l'agent de sélection appliquée. On parle de phénomène d'échappement.

Le gène de sélection peut conférer une résistance par plusieurs mécanismes : soit il code pour une protéine qui permet de détoxifier l'agent de sélection, soit il code pour une protéine mutée, insensible à l'agent de sélection, soit il surexprime un gène, qui permet d'accroître la résistance à l'agent de sélection. Parmi les gènes permettant d'obtenir une résistance aux antibiotiques, les plus couramment utilisés sont : le gène *nptII* qui code pour la néomycine 3'-O-phosphotransférase et qui confère la résistance aux antibiotiques du type aminoglycoside tels que la kanamycine.

3.3. Gènes rapporteurs

Le gène rapporteur code pour une enzyme généralement absente des cellules de la plante mère et dont l'activité est aisément détectable dans les cellules transformées. Ce gène est utilisé lors de l'optimisation des protocoles de transformation. L'activité d'un

La transgénèse végétale

gène rapporteur se traduit par une modification visible de la couleur des explants l'exprimant dans des conditions particulières (présence de substrat, pH, UV).

Tableau 04 : Marqueurs de sélection : antibiotiques (Franche, 2013).

Gène marqueur	Produit du gène	Antibiotique
<i>nptII</i>	neomycine phosphotransferase II	kanamycine paromomycine geneticine, neomycine
<i>hpt</i>	hygromycine phosphotransferase	hygromycine B
<i>SPT</i>	streptomycine phosphotransferase	streptomycine
<i>aadA</i>	aminoglycoside-3'-adényltransferase	streptomycine
<i>gat</i>	gentamycine acetyl transferase	kanamycine
<i>bsr</i>	blasticine S deaminase	blasticine S
<i>aacCI</i>	gentamicine-3-N-acetyltransferase	gentamicine
<i>sulI</i>	dihydrodipicolinate	sulfonamides

Le gène rapporteur doit être choisi en fonction de la nature du matériel végétal. En effet, certaines plantes ont des activités endogènes qui sont capables de masquer l'expression d'un gène rapporteur. Après la transformation génétique, on peut distinguer trois cas : les explants ne sont pas transformés mais naturellement résistants à l'agent sélection. L'ADN peut avoir été transféré partiellement et alors le gène de résistance à l'antibiotique est présent mais pas le gène rapporteur (ou en partie). Les deux gènes ont été transférés.

Parmi les gènes rapporteurs les plus utilisés, on peut citer le gène lac Z qui code pour l'activité β -galactosidase. Le gène gus code l'enzyme de la β -glucuronidase capable d'hydrolyser certains composés glucuroniques. Cette enzyme, en présence du substrat X-Gluc (acide 5-bromo-4- 51 chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide) conduit à l'apparition d'un produit de couleur bleue (**Figure 27**).

Le gène gfp code la Green Fluorescent Protein (GFP - protéine verte fluorescente). Cette protéine de 27 kDa a été isolée de la méduse *Aequora victoria*. Elle devient vert fluorescent quand elle est excitée par des ultraviolets ou de la lumière bleue (**Figure 28**). L'utilisation du gène codant la GFP présente de nombreux avantages parce qu'elle ne

La transgénèse végétale

nécessite pas l'addition de substrat, ni de cofacteur), et surtout parce qu'elle ne nécessite pas la destruction de l'échantillon étudié, ce qui permet notamment de faire une étude des variations de son expression au sein des mêmes tissus au cours du temps (**Tableau 05**). Des nombreuses autres protéines fluorescentes semblables à la GFP mais n'émettant pas aux mêmes longueurs d'ondes, sont utilisées comme rapporteur, par exemple: la YFP (Yellow Fluorescent Protein) et la dsRed (protéine tétramérique).

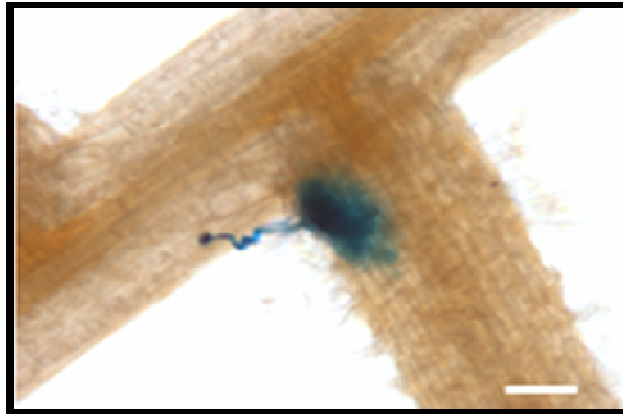


Figure 27 : Expression de gus dans le poil absorbant de *Casuarina glauca* (Benabdoun, 2012).

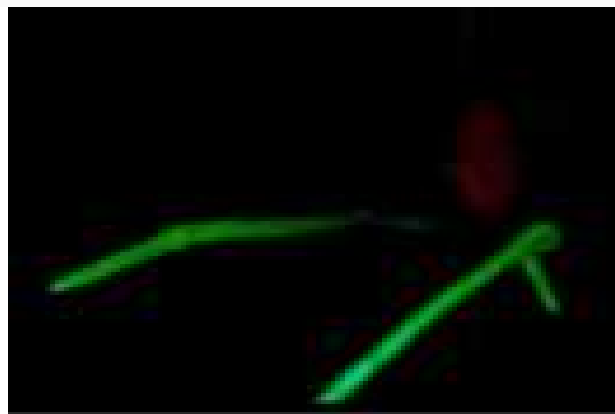


Figure 28 : Expression de la gfp dans les chevelus racinaires de *Casuarina glauca* (Benabdoun, 2012).

Afin de déterminer la localisation subcellulaire du gène scr chez *Arabidopsis thaliana*, une fusion traductionnelle entre le promoteur du gène scr et la séquence codante du gène scr a été réalisée. Ce dernier qui va permettre d'exprimer la protéine de fusion SCR-GFP et d'observer sa localisation subcellulaire (**Figure 29**).

La transgénèse végétale

Tableau 05 : gus VS gfp (Franche, 2013)

Propriétés	<i>gus</i>	<i>gfp</i>
Mise en évidence de l'activité	réaction létale	réaction non létale
Sensibilité de la réaction	élevée	élevée
Simplicité de la réaction	oui	oui
Précision des dosages quantitatifs	bonne	moyenne
Besoin d'un équipement spécifique	non	oui
Coût des expériences	élevé	faible

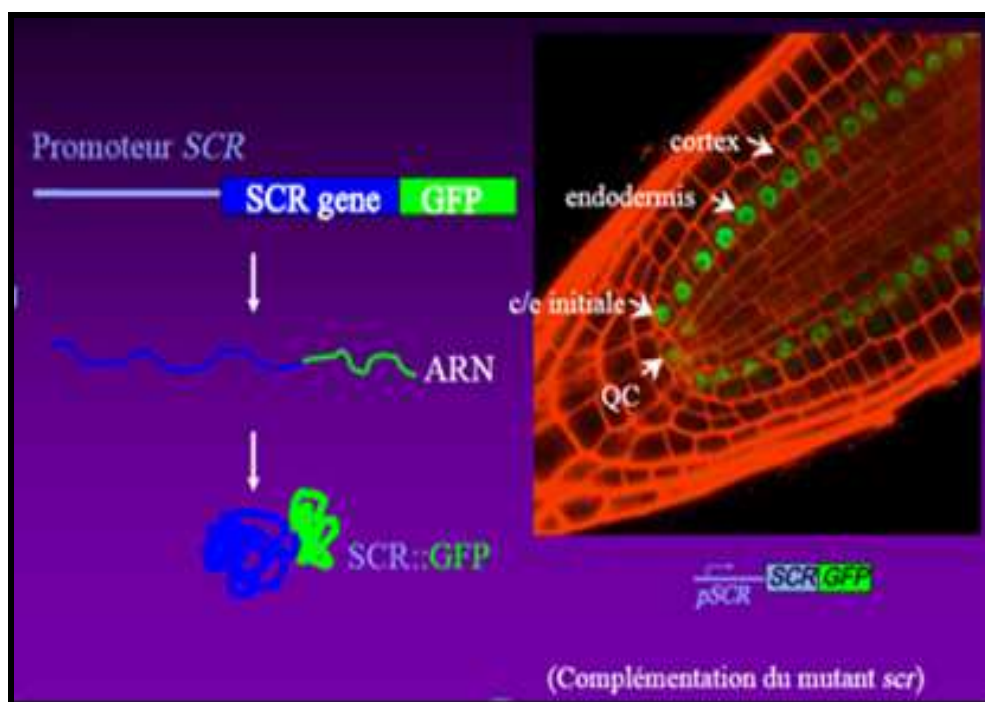



Figure 29 : Fusion traductionnelle : SCR :: GFP (Roudier, s.d.).

La transgénèse végétale

VII. Transfert d'ADN et obtention de plantes transgéniques

1. Régénération *in vitro* et *in planta* des plantes transgéniques

1.1. Culture *in vitro* des plantes transformées avec *Agrobacterium tumefaciens*

Les conditions nutritives de la régénération d'une plante *in vitro* sont contrôlées par la balance hormonale auxines/cytokinines dans le milieu de culture. L'objectif premier est d'obtenir une formation de bourgeons adventifs (caulogénèse) en apportant au milieu de culture une balance cytokinines/auxines élevée. Les jeunes pousses produites sont ensuite enracinées dans un milieu de rhizogénèse avec en général apport d'auxine dans des conditions d'aspesie. L'obtention d'une plante transformée nécessite que l'on déclenche l'organogénèse dans les cellules initialement transformées et sélectionnées par un antibiotique ou un herbicide.

Les explants utilisés pour la transformation varient énormément en taille : de la cellule ou du protoplaste isolé aux organismes entiers comme des embryons zygotiques, en passant par des colonies cellulaires des tissus, ou des organes comme des feuilles, des hypocotyle ou des racines. Dans tous les cas, les conditions expérimentales sont à définir pour chaque plante et chaque tissu.

1.2. Culture *in vitro* des plantes transformées avec *Agrobacterium rhizogenes*

Dans le cas de la transformation des plantes par *A. rhizogenes*, des plantes entières peuvent être régénérées par bourgeonnement adventif à partir de culture *in vitro* de racines transformées excisées formant des *hairy roots*. On a exploité cette croissance rapide d'un système racinaire transformé pour produire des plantes composites, constituées d'une partie aérienne non transformée et d'un système racinaire transformée après suppression du système racinaire initial non transformé

1.3. Imbibition des graines

En 1987, Feldman et ses collègues ont décrit pour la première fois une technique de transformation *in planta* d'*Arabidopsis thaliana*. Des graines préalablement hydratées ont été incubées avec une souche désarmée d'*Agrobacterium tumefaciens* (C58) ; cette souche

La transgénèse végétale

contient dans un vecteur binaire le gène nptII. Après le développement et la fructification des plantes, des graines de la nouvelle génération ont manifesté une résistance à la kanamycine. Certaines germinations de la première et de la deuxième génération possédaient des séquences d'ADN-T intégrées dans leur génome. Le transfert de l'ADN-T aurait lieu directement, par les espaces intercellulaires, ou indirectement dans les cellules destinées à donner naissance au cours de l'ontogenèse aux gamétophytes mâles et femelles.

1.4. Agroinfiltration

L'agroinfiltration *stricto sensu* est une technique impliquant l'utilisation comme vecteur de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* introduit de manière mécanique, *in vivo* ou *ex vivo*, dans un tissu végétal, et aboutissant à l'expression transitoire d'un ou plusieurs gènes d'intérêt dans les cellules végétales agroinfiltrées. Techniquement, l'agroinfiltration consiste en l'introduction intratissulaire, à l'aide d'une seringue, d'une suspension d'agrobactéries comportant un plasmide « désarmé » sur lequel se trouvent les gènes d'intérêt à transmettre, dans les feuilles d'une plante (**Figure 30**). La plante la plus utilisée est le tabac. Une alternative est l'utilisation d'une pompe à vide pour infiltrer la suspension bactérienne dans les tissus végétaux. La combinaison de ces deux méthodes peut également être utilisée.



Figure 30 : Agroinfiltration de feuilles de *Nicotiana benthamiana* avec *Agrobacterium tumefaciens*, à l'aide d'une seringue (Leuzinger *et al.*, 2013).

Une fois infiltrées, les agrobactéries se trouvent dans l'espace intercellulaire, elles n'entrent pas dans les cellules végétales. Une ou plusieurs copies de l'ADN-T sont transférées dans les cellules végétales de la zone injectée. L'intégration de l'ADN-T dans le génome des cellules végétales est rare, mais peut néanmoins se produire dans quelques cellules de la zone agroinfiltrée.

La transgénèse végétale

Cependant, le but de l'agroinfiltration *stricto sensu* n'est absolument pas de régénérer une plante entière à partir de ces cellules génétiquement modifiées qui seront détruites en fin d'opération. Généralement, l'expression est limitée à la zone injectée ; en effet, les agrobactéries restent localisées dans la zone infiltrée, où elles peuvent se multiplier si les conditions sont favorables. Des mouvements de bactéries vers des zones non infiltrées et notamment vers des organes de reproduction (avec contamination potentielle de graines) sont concevables mais restent très peu probables. L'intégration de l'ADN-T dans le génome de cellules germinales est donc théoriquement possible mais très improbable. Cependant, les données pour évaluer rigoureusement la fréquence de ces événements sont manquantes. L'utilisation de cette technique sur des plantes entièrement broyées, récoltées avant floraison, permet d'éviter le risque de transmission. Dans le cas de l'agroinfection ou agroinoculation, en conditions *in vivo*, l'ADN-T peut contenir un matériel répliatif (génom viral entier) dans le but d'obtenir une expression en dehors de la zone agroinfiltrée, voire dans toute la plante.

2. Caractérisation moléculaire des transformants

Lorsque l'on transforme génétiquement une plante, il est important de déterminer rapidement si l'ADN transféré est intégré dans le patrimoine génétique de la plante. En effet, la sélection des cellules sur un milieu contenant l'agent de sélection n'est pas suffisamment fiable. Certaines cellules, bien que non transformées, parviennent quand même à se développer sur le milieu de sélection. La présence de transgène peut être révélée par PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Pour caractériser si ce gène s'exprime, la PCR reverse RT-PCR) peut être utilisée ce qui permet de vérifier la présence d'ARN messager, transcrit spécifiquement à partir du gène introduit. Le taux d'expression du transgène peut aussi être quantifié par PCR en temps réel (Q-PCR). Une analyse pourra aussi être réalisée par hybridation moléculaire ADN-ADN, selon la technique de Southern. Seule l'hybridation spécifique permet de démontrer que le gène transféré est intégré dans le génome.

3. Caractérisation biochimique des transformants

Après vérification de la présence du nouveau gène dans la plante, il est nécessaire de déterminer si ce gène produit ou non la protéine désirée et en quelle quantité. Pour tester la

La transgénèse végétale

présence et l'activité de la protéine, un test Elisa (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*, Immuno-essais avec couplage enzymatique) est utilisé.

4. Tests supplémentaires

Des analyses portent également sur le comportement général de la plante. Il s'agit de savoir si le gène introduit confère le caractère souhaité, et de valider l'efficacité du caractère. D'autre part, la localisation d'insertion du gène étranger peut interférer avec le métabolisme général de la plante. Il faut donc vérifier que le potentiel de la plante n'est pas atteint. Ainsi, des tests en serre et en champ sont menés. Il est notamment très important de vérifier que le comportement au champ de plantes transgéniques correspond à celui attendu sur la base des observations effectuées en serre sur une ou quelques plantes. A ce stade, le niveau et la stabilité de l'expression du caractère dans différentes conditions de culture sont évalués. Seules quelques plantes seront retenues. Enfin, il faut caractériser la transmission du caractère à la descendance.

VII. Applications agronomiques et industrielles

La transgénèse est un moyen essentiel pour étudier le rôle des gènes dans l'expression des fonctions biologiques ainsi que leur fonctionnement. Elle permet également d'envisager des applications biotechnologiques diverses. De nouveaux outils, qu'il est encore nécessaire de perfectionner, permettent de mieux utiliser la transgénèse pour des études fondamentales et de développer diverses applications dans les domaines agronomique et industriel.

1. Dans le secteur agronomique

Dans le domaine agronomique, les avancées de la transgénèse commencent à être significatives pour les végétaux. Les transformations opérées sur les plantes visent principalement à les rendre résistants aux différents stress biotiques et abiotiques.

1.1. Des plantes résistantes aux herbicides

On appelle herbicide toute substance active ou une préparation ayant la propriété de tuer les végétaux. En protection des cultures et en sylviculture, les

La transgénèse végétale

herbicides sont employés pour lutter contre les adventices, ou "mauvaises herbes ».

On distingue différents types d'herbicides selon la migration de l'herbicide :

- ✓ Herbicide de contact : l'herbicide détruit les surfaces de la plante avec lesquels il entre en contact, il n'est pas véhiculé par la sève.
- ✓ Herbicide systémique : herbicide de pré-levée ou de post-levée qui migre dans la plante par le bois ou le liber, depuis les points de pénétration (racine ou feuille) jusqu'au site d'action.

Et selon sa sélectivité :

- ✓ Herbicide sélectif : herbicide que peut tolérer une espèce cultivée dans des conditions d'emploi définies. Il n'est généralement efficace que sur certaines adventices.
- ✓ Herbicide total : herbicide efficace sur l'ensemble des adventices et aussi des espèces cultivées.

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

Différentes stratégies de transgénèse ont été mises au point pour rendre les plantes utiles résistantes aux herbicides. L'une des possibilités consiste à rendre la plante moins sensible à l'herbicide (par surproduction de l'enzyme détruite par l'herbicide, par modification de l'enzyme cible pour la rendre insensible à l'herbicide ou par diminution de l'absorption d'herbicide par la plante utile). Une autre stratégie vise à faire synthétiser par la plante un produit qui détruit l'herbicide (procédé de détoxification : transformation d'une sub. toxique en sub. inoffensive). Cette stratégie est la plus satisfaisante car elle aboutit à des composés moins toxiques pour l'homme et les animaux. Le gène responsable de la détoxification des triazines provenant du maïs a été transféré à du soja et des plants de tabac.

La transgénèse végétale

✓ Maïs tolérant au Roundup

Le Roundup est un herbicide systémique non sélectif commercialisé par Monsanto. Il pénètre à travers les organes aériens de la plante, et migre de son point de pénétration jusqu'aux points de croissance (apex, méristèmes) à travers toute la plante (tige, feuilles, racines). Le glyphosate est le nom du principe actif présent dans le Roundup.

Les cultures Roundup Ready de Monsanto sont des plantes qui ont été génétiquement améliorées par l'insertion de la séquence codante CP4 EPSPS. L'expression de la protéine CP4 rend les cultures tolérantes aux herbicides de Roundup, ce qui permet une application excessive de l'herbicide pour lutter contre les mauvaises herbes sans mettre en danger la sécurité de la culture.

1.2. Des plantes protégées contre les ravageurs

Les insectes, les virus, les champignons et les bactéries sont responsables de pertes importantes en production végétale (37% de la production agricole). Or, il existe une alternative pour rendre les plantes résistantes à ses différents parasites et ainsi éviter l'utilisation abusive des pesticides et apportent donc un gain significatif en matière de cout et de pollution.

a. Des plantes résistantes aux insectes

Les insectes nuisibles causent des dommages importants aux plantes et peuvent détruire des cultures entières et des stocks de graines, ce qui a souvent des conséquences économiques et alimentaires importantes. L'augmentation des températures liée au changement climatique, particulièrement marqué en Afrique, conduit à une amplification de ces pertes.

Donner aux plantes la possibilité de se défendre contre les insectes présente de nombreux avantages sur l'utilisation des insecticides : il n'y a plus de risque de "lessivage" de l'insecticide par la pluie, seuls les insectes qui attaquent la plante sont tués et la plante est protégée jusqu'aux racines.

La transgénèse végétale

✓ Maïs Bt

La pyrale (*Ostrinia nubilans*) est un papillon qui pond ses œufs par plaque sur la face inférieure des feuilles de maïs. L'insecte creuse des galeries dans les tiges, les pédoncules d'épis et les épis, entravant ainsi le courant de la sève et lésant tous les organes végétatifs. L'allongement du maïs est inhibé. Les entrenœuds sont plus courts, les feuilles et les épis plus petits. Les floraisons mâle et femelle sont retardées. Cette atteinte à la vigueur des plants provoque une baisse de la production grainière. Les galeries fragilisent la plante, les tiges sont donc plus sensibles à la casse et à la verse en fin de culture. Les galeries creusées dans le pédoncule peuvent provoquer la chute de l'épi femelle. Les épis sont infestés de chenilles ou de leur sciure et comportent des grains endommagés. Les chenilles sont aussi responsables de dégâts indirects. En effet, elles favorisent le développement des fusarioses, d'une part en véhiculant les spores, et d'autre part en causant des blessures sur les grains qui facilitent l'installation du champignon (**Figure 31**). L'ensemble de ces dégâts peut occasionner des pertes de rendement allant jusqu'à 30% en cas de forte infestation

La bactérie *Bacillus thuringiensis* constitue un véritable réservoir de gènes de résistance aux insectes. En effet, les différentes souches de cette bactérie du sol recèlent plusieurs protéines insecticides ayant différents modes d'action, et affectant uniquement certains insectes. Chacune de ces protéines est codée par un seul gène, c'est donc un caractère facilement transférable par génie génétique. Plusieurs équipes ont obtenu des tabacs, des pommes de terre, des cotons, des tomates, des maïs résistants à des insectes grâce à cette source de gènes.

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



Figure 31 : Effet de la pyrale sur du maïs non transgénique et sur du maïs Bt (Alexander, 2013).

b. Des plantes résistantes aux virus

Parmi les nombreuses attaques que doivent subir les plantes, les virus sont les plus nocifs car il n'existe aucun traitement curatif. Or, les maladies virales constituent un problème extrêmement répandu dans le monde végétal, causant d'importants dégâts dans certaines cultures. Chez la pomme de terre, le manioc, le riz, les infections virales peuvent occasionner jusqu'à 80 % de perte sur une même récolte. De plus, on considère que les pertes de rendement occasionnées par les virus s'élèvent à plus de 10% chaque année pour les plantes de grandes cultures.

Après avoir été infectées par un virus peu virulent, les plantes résistent à l'infection par un autre virus plus agressif du même type. Les protéines de l'enveloppe virale jouent un rôle dans la protection des plantes, on utilise des transgène codant pour des protéines de la capsid du virus pour rendre la plante résistante.

✓ *Haricot résistant au virus de la mosaïque*

En 2011, des chercheurs de l'Institut de recherche publique brésilien (EMBRAPA) ont travaillé dix ans pour obtenir un haricot génétiquement transformé résistant au virus de la mosaïque et autorisé à la culture par la commission technique de biosécurité brésilienne en 2011. La technique de modification sur le haricot est celle de l'interférence par ARN. Elle

La transgénèse végétale

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

c. Des plantes résistantes aux champignons

✓ Pomme de terre résistante au mildiou

Concernant les champignons, beaucoup de variétés de pomme de terre sont sensibles au mildiou (maladie cryptogamique). Les croisements par sélection conventionnelle n'ont pas permis de créer de variétés tolérantes à cette maladie qui cause de nombreux dégâts sur le rendement et la qualité. Une pomme de terre de table génétiquement modifiée résistante au mildiou existe. Elle contient deux gènes de résistance issus d'espèces sauvages d'Amérique du Sud, zone d'origine de la pomme de terre. Cette pomme de terre transgénique n'est pas développée actuellement en Europe.

1.3. Des plantes résistantes aux stress abiotique

Les contraintes environnementales comme la sécheresse, la salinité des sols et les basses températures affectent la croissance et le rendement des plantes. De nombreuses chaînes métaboliques sont généralement affectées au cours de ces contraintes.

a. Des plantes tolérantes à la sécheresse

Les sélectionneurs ont caractérisé et développé des variétés de plantes tolérantes à la sécheresse grâce à la connaissance plus précise des gènes et de leur rôle, et aux capacités d'analyse des plateformes de phénotypage.

✓ Maïs tolérant à la sécheresse

Un maïs OGM tolérant à la sécheresse a été testé à grande échelle en 2012 sur 4000 hectares par 250 agriculteurs dans l'ouest américain. Il contient un gène qui intervient dans le maintien de la photosynthèse en cas de stress hydrique. Ce gène, d'abord repéré dans le cas de la résistance au froid, code une protéine qui facilite la mise en place de nombreuses réactions cellulaires. Il est associé à une séquence qui n'autorise son expression qu'en cas

La transgénèse végétale

de stress hydrique. Ce gène est actuellement testé en combinaison avec d'autres modifications génétiques, car les essais montrent qu'une croissance efficace des plantes favorise aussi la tolérance à la sécheresse.

b. Des plantes résistantes à la submersion lors d'inondations

✓ *Pomme de terre résistante aux inondations*

Le CIP (Le Centre international de la pomme de terre) du Pérou produit des variétés de pomme de terre génétiquement modifiées pour leur résistance aux inondations. De nouvelles variétés de riz possédant un gène qui permet à la plante de résister à des inondations de plusieurs jours à deux semaines ont été également créées. En effet, les moussons en Asie du Sud et du Sud-est peuvent provoquer d'importantes inondations entraînant la disparition complète des cultures de riz submergées.

c. Des plantes affranchies d'engrais

Les bactéries du genre *Rhizobium* sont logées dans les racines de la plante transforment l'azote de l'air en composés qu'elles fournissent à la plante. En échange de ces nutriments indispensables, les bactéries reçoivent des glucides énergétiques synthétisés par la plante. Les plantes qui ne vivent pas en symbiose sont contraintes de consommer les nitrates du sol, ce qui entraîne l'utilisation d'engrais azotés pour les cultures intensives. L'introduction des gènes bactériens contrôlant l'ensemble des phénomènes de la fixation de l'azote (les gènes "nif") dans des céréales fut proposée. Ce projet n'a pas encore totalement abouti et se trouve confronté à des difficultés (il y a une vingtaine de gènes "nif" !).

✓ *Céréales et assimilation de l'azote*

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

La transgénèse végétale

✓ Arabidopsis et assimilation de l'azote

Chez la plante modèle *Arabidopsis*, un facteur de transcription (protéine régulatrice de l'expression des gènes) intervenant dans les métabolismes azoté et carboné a été étudié. Sa surexpression favorise l'efficacité d'utilisation de l'azote. Ce résultat montre qu'il pourrait être intéressant de surexprimer des gènes régulateurs. Ces projets sont en cours de développement et n'ont pas atteint le stade de la commercialisation.

d. Des plantes pour nettoyer les sols pollués

De même, des plantes capables de capter des ions métalliques toxiques présents naturellement dans le sol ou apportés à la suite d'une activité industrielle, ont été obtenues.

1.4. Des plantes décoratives

✓ Pétunias transgéniques

Pour rendre la couleur d'un pétunia plus intense, des chercheurs ont introduit une copie supplémentaire d'un gène de coloration. Le résultat est que certaines fleurs présentent des zones incolores tandis que d'autres sont plus foncées. On crée ainsi des fleurs ayant de nouvelles couleurs. Des pétunias plus résistants au froid (-6°C) ont été aussi obtenus.

✓ Œillets transgéniques

Des œillets sont commercialisés en Europe avec une production de nouveaux pigments qui donnent une coloration violette. 75 millions d'œillets GM vendus en 2010 par la société australienne Florigènes des travaux visant à restaurer le parfum de roses ralentir le flétrissement des campanules et de *Kalanchoe blossfeldiana*.

1.5. Des plantes mâles stériles

La stérilité mâle est obtenue par transfert du gène "barnasse" codant pour une RNAs de bactérie lié à un promoteur permettant de l'exprimer seulement dans le tapetum (zone nécessaire au développement du pollen). Une fois le tapetum détruit, le pollen privé de nourriture meurt. Par ce procédé, il devient possible de féconder le blé par un autre pollen que le sien.

2. Dans le secteur industriel

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

2.1. Production de pâtes à papier

Les lignines, constituants majeurs du bois, ne peuvent pas être valorisées par l'industrie papetière. Elles doivent être éliminées par des méthodes coûteuses et très polluantes car utilisant des solvants. Des travaux conduits par la recherche publique française ont permis d'identifier les gènes impliqués dans la synthèse des lignines et de développer des variétés de peupliers transgéniques, chez lesquels le taux de lignine est fortement réduit.

Le blanchissement de la pâte à papier issue de ces peupliers nécessite ainsi moins de solvants ce qui réduit l'impact sur l'environnement. Le même type de travail a été réalisé dans le cas de l'eucalyptus. En ce qui concerne l'utilisation de l'amidon pour l'industrie des papiers, du textile et des adhésifs, les composants de l'amidon recherchés sont les amylopectines. Les variétés conventionnelles de pomme de terre contiennent 20% d'amylose qu'il faut extraire afin de ne conserver que les amylopectines. Ainsi, une pomme de terre a été génétiquement modifiée pour contenir un amidon composé presque exclusivement d'amylopectines.

2.2. Les huiles industrielles

Elles sont synthétisées à partir de matières premières fossiles (pétrole), dont les ressources sont limitées. Il est donc nécessaire de s'orienter vers d'autres ressources renouvelables. Parmi les nombreux programmes de recherche, on peut citer celui destiné à l'obtention d'un colza transgénique à haute teneur en acide gras érucique ou ricinoléique pour la production de lubrifiants, de matières plastiques, etc. Cette stratégie devrait favoriser le développement de lubrifiants et de plastiques biodégradables.

La transgénèse végétale

✓ Colza transgénique

De plus, de nouvelles variétés de colza ont été obtenues par transgénèse pour diminuer la viscosité et augmenter l'indice d'octane du diester. Actuellement, les huiles représentent seulement 43% de la masse des graines de colza. Des recherches sont menées pour accroître ce rendement. Ainsi, le gène qui code l'enzyme intervenant dans la dernière synthèse de l'huile a été isolé. Des copies supplémentaires de ce gène ont été introduites dans du colza. Certaines graines ont ainsi produit une quantité d'huile correspondant à plus de 75% de leur masse.

2.3. Les colorants

✓ Cas du coton

Un exemple original est l'obtention de cotons transgéniques de couleur grâce à l'introduction d'un gène bactérien ou végétal codant pour un pigment. Ceci évitera l'utilisation de teintures chimiques difficilement recyclables et sources de pollution.

3. D'autres applications

3.1. Dans le secteur agroalimentaire

Dans ce domaine, les champs d'application potentiels sont très variés : il peut s'agir de la production de protéines impliquées dans des procédés agroalimentaires, ou de la modification de certaines propriétés des végétaux pour optimiser leur utilisation. Ces applications vont contribuer très significativement à apporter aux communautés humaines des aliments en quantité suffisante et ayant des qualités nutritives améliorées par des méthodes plus douces et moins polluantes.

a. Améliorer les qualités nutritionnelles

En alimentation animale, les recherches vont dans le sens d'un développement de plantes permettant un meilleur bilan nutritionnel et évitant l'apport de compléments nutritifs. Ainsi, il est possible d'obtenir des plantes de maïs, colza, soja à teneurs élevées en acides aminés, notamment en méthionine et lysine, et des maïs enrichis en huile.

La transgénèse végétale

Concernant l'alimentation humaine, des travaux sont menés pour diminuer les propriétés allergènes du riz et du soja. Pour obtenir ce résultat, on cherche à introduire dans la plante un transgène qui inhibe la synthèse de la protéine allergisante. D'autres travaux ont permis de modifier la teneur en amidon de la pomme de terre et de disposer ainsi de variétés mieux adaptées à la fabrication de féculé, de purée ou de chips.

✓ Des plantes plus riches en éléments essentiels (vitamines et acides aminés)

Par ailleurs, la modification volontaire du génotype des plantes par la transgénèse peut permettre d'apporter aux consommateurs des aliments plus riches en éléments essentiels.

• Cas du manioc

De plus, pour réduire les carences dues aux manques de protéines (fournit seulement 30% des besoins protéiques), de vitamines et de fer, un programme BioCassava Plus, public-privé, est conduit par le Danforth Plant Science Institute (américain) et des organismes africains (Nigéria et Kenya). Il s'agit de développer par transgénèse des plantes de manioc qui cumulent plusieurs caractéristiques : une résistance aux virus, une diminution de la teneur en cyanure ou de ses dérivés, et une augmentation des teneurs en protéines, en fer et en provitamine A.

• Le riz doré :

Un autre exemple est celui du riz doré, enrichi en beta-carotène, précurseur de la vitamine A. l'objectif recherché est de réduire les carences en cette vitamine, lesquelles provoquent des cas graves de cécité. Le riz doré est donc capable de fournir un supplément de vitamine A aux 400 millions d'êtres humains qui en manquent et sont menacés de perdre la vue ainsi, que de fer aux quatre milliards de personnes carencées. Ce dernier exemple rejoint deux domaines : en effet, ici la transgénèse dans l'agronomie est liée à la médecine.

✓ Diminution de substances impropres à la consommation

• Cas du cotonnier

Le gossypol est un composé phénolique toxique qui présent dans des glandes de tous les tissus du cotonnier, y compris dans les graines. Son rôle est de protéger la plante contre

La transgénèse végétale

pathogènes et les insectes. Le but des travaux qui ont été menés est de créer des PGM de coton sans (ou avec peu) de gossypol.

✓ Augmentation du contenu en acides gras (plantes oléagineuses)

Des gènes ont également été transférés chez le colza pour modifier la teneur en acides gras ou pour obtenir des huiles contenant des acides gras recherchés en alimentation humaine.

• Du soja transgénique

Le profil lipidique de l'huile de soja ne permet pas de la conserver longtemps sans transformation industrielle. De plus, elle ne peut pas être chauffée et donc utilisée pour de la friture. Pour permettre une utilisation au four ou à la poêle, l'huile de soja ordinaire est généralement hydrogénée. Par ce procédé, on diminue la teneur en acides gras insaturés mais on induit la production d'acides gras « trans ». Une nouvelle variété de soja génétiquement modifiée, contenant moins d'acides gras insaturés et plus stable à la chaleur, a été autorisée en 2010 par l'USDA (Département Américain de l'Agriculture). Dans ce cas, l'hydrogénation n'est pas nécessaire et cette huile présente une composition plus saine en acides gras.

✓ Retarder la maturation des fruits

Dans le cas du melon et de la tomate, des variétés transgéniques à maturation retardée ont été obtenues. Ces fruits peuvent être récoltés à un stade de maturation plus avancé, ils sont donc plus savoureux. D'autre part, une meilleure conservation et une aptitude au transport améliorée réduisent les pertes.

• Un melon à maturation retardée

Le melon est le premier fruit génétiquement modifié obtenu par un laboratoire de recherche français. La synthèse de l'éthylène, hormone responsable de la maturation des fruits, a été en partie inhibée par l'introduction d'un gène antisens. Ainsi, le détachement du fruit est retardé et le melon maintenu sur pied continue d'accumuler des sucres. Il n'a pas encore fait l'objet d'une demande de commercialisation.

La transgénèse végétale

3.2. Dans le domaine médical

✓ Les produits sanguins

Des recherches menées en France ont permis de produire des protéines plasmatiques à partir de tabacs et de pomme de terre transgéniques, permettant l'obtention d'hémoglobine humaine recombinée. Cette albumine devrait être moins chère que celle issue du plasma sanguin.

✓ Les vaccins

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

✓ Les protéines humaines

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

Des travaux très avancés ont été aussi conduits en France sur la production de lipase gastrique par des maïs transgéniques. La lipase gastrique est une protéine utilisée dans le traitement de l'insuffisance pancréatique exocrine (impossibilité pour le pancréas de faire passer dans le système digestif les enzymes nécessaires à l'assimilation des aliments). L'absence de lipase gastrique empêche le système digestif de métaboliser les lipides contenus dans la nourriture. Ce problème affecte principalement les patients atteints de mucoviscidose ou de pathologies du pancréas. Le gène humain codant pour cette lipase a été transféré avec succès à des maïs adaptés à la production de molécules à rôle pharmaceutique.

VIII. Les plantes transgéniques et leur impact sur l'environnement et la santé

1. Impact des PGM sur l'environnement

1.1. Effet direct des PGM sur l'environnement

Outre les pratiques agricoles en général, la culture d'une plante en particulier peut avoir des incidences supplémentaires sur l'environnement en raison de ses caractéristiques intrinsèques.

a. Utilisation de produits phytosanitaires

Les plantes Bt reçoivent des informations génétiques de la bactérie *Bacillus Thuringiensis* qui leur permettent de synthétiser une ou plusieurs protéines nocives pour certains insectes et ces plantes la se préservent elles-mêmes d'un ou plusieurs groupes d'insectes. De ce fait, les plantes Bt n'ont plus à être traitées avec des substances chimiques ou biologiques supposés les protéger.

On cite comme exemple le coton qui est cultivé sur 2.5% de la surface agraire mondiale et maïs qui est responsable à lui seul de 16% de l'utilisation d'insecticide dans le monde. En 2013 la culture de coton Bt a permis de réduire l'utilisation d'insecticides de 48.3%. En outre, la culture à grande échelle de plantes OGM résistantes aux maladies entraîne une diminution globale des maladies, ce qui réduit à son tour l'utilisation de pesticides dans les cultures non OGM voisines.

b. Effets sur le papillon monarque

En 1999, des biologistes américains soulèvent le problème de la toxicité du pollen des plantes Bt pour les chenilles de papillon monarque vivant en bordure des champs. L'ingestion de ce pollen provoquerait un ralentissement de la croissance et une mortalité des chenilles. Cette étude a fait grand bruit dans les médias car le papillon-monarque est protégé, et a une grande valeur symbolique pour les américains. Ces travaux ont été ensuite contredits, l'effet aurait été sur-évalué lors de la première étude. Il est à noter que, même si le pollen Bt avait présenté une toxicité sensible pour ces chenilles, ceci problème n'aurait pas été plus grave avec les OGM qu'avec les autres méthodes de lutte contre les insectes.

La transgénèse végétale

Les insectes vivant en bordure de champs sont vraisemblablement beaucoup plus affectés par l'application d'insecticides, ou même par l'aspersion de pathogènes utilisés en lutte biologique comme la bactérie *Bacillus thuringiensis*. Il est donc important de dissocier l'effet médiatique de l'impact écologique réel.

c. L'abeille mellifère et d'autres organismes non cibles

Les plantes produisent certaines substances de protection pour s'armer contre des pathogènes ou des phytophages. Les lectines dont l'action n'est pas nécessairement très spécifique, en sont un parfait exemple. L'abeille mellifère est au cœur des attentions. Elle est utile non seulement pour produire du miel, mais également responsable de la pollinisation d'un quart des plantes. La multiplication des plantes dépend donc de cette bonne pollinisation pour une récolte à la fois qualitative et quantitative. Partout dans le monde les apiculteurs voient leurs populations d'abeilles régresser, et ils en font porter la responsabilité majoritairement aux plantes OGM. Mais on observe un taux de mortalité anormalement élevé des abeilles mellifères en Belgique et pourtant aucune plante OGM n'y est cultivée à des fins commerciales, de ce fait les plantes OGM ne seraient pas forcément à l'origine de la régression des populations d'abeilles.

L'abeille est un insecte qui, dans le cadre de son travail de pollinisation entre en contact avec de grandes quantités de pollen contenant des protéines Bt. Les protéines Bt possèdent un mécanisme d'action très spécifique, une fois ingérée, cette dernière est reconnue par des récepteurs spécifiques situés sur la paroi intestinale de l'insecte cible, or les abeilles n'ont pas de récepteur pour les protéines Bt utilisées aujourd'hui dans l'agriculture ce qui fait qu'elles ne peuvent pas être sensibles aux plantes Bt actuellement autorisées.

d. Rendement par unité de surface

La demande mondiale croissante de produits agricoles destinés à l'alimentation humaine et animale et à la fabrication de carburants exerce une lourde pression sur l'environnement et sur la surface agricole disponible. La maîtrise de l'extension de cette dernière est essentielle pour prévenir la perte de végétation naturelle et de biodiversité. Les économistes Evenson et Rosegrant ont calculé qu'en 2000, la surface agricole aurait augmenté de 3 à 5% si les plantes agricoles n'avaient pas été génétiquement améliorées par

La transgénèse végétale

sélection végétale depuis 1965. Cela représente une économie 24 à 32 millions d'hectares réalisée grâce à l'évolution de la technologie entre 1965 et 2000.

e. Dispersion des gènes par le pollen

Le risque de pollinisation croisée entre plantes cultivées et variantes sauvages a toujours existé et le transfert de gènes entre plantes améliorées et espèces sauvages croissables a lieu depuis l'invention de l'agriculture. Plusieurs éléments déterminent la probabilité d'une dispersion des gènes par le pollen :

- Le mode de transmission du pollen (vent, insectes), la distance entre les plantes et la durée de vie du pollen.
- La synchronisation de la floraison des plantes.
- La compatibilité sexuelle ou la capacité des deux plantes à produire une descendance féconde.
- L'écologie de la population sauvage et la mesure dans laquelle le gène obtenu peut offrir un avantage sélectif aux espèces sauvages.

Toutefois, la technique utilisée pour améliorer les plantes (croisement, sélection par mutation, technologie OGM) n'influence aucunement l'impact de la propagation des gènes dans la nature. En effet, cet impact dépend entièrement des gènes et donc des propriétés codant les gènes répandus.

La dispersion de gènes dans la nature n'a d'incidence sur l'environnement que si le gène peut offrir un avantage sélectif aux plantes croissables avec la plante cultivée. Les plantes sauvages obtenant un avantage sélectif de cette manière peuvent perturber l'équilibre écologique existant et causer la disparition d'autres plantes.

f. Transfert horizontal de gènes

La dispersion du pollen telle que décrite précédemment peut entraîner le transfert d'informations génétiques d'un parent à sa descendance. C'est ce qu'on appelle le transfert vertical de gènes. Mais le transfert de gènes peut également être « horizontal ». Dans ce

La transgénèse végétale

cas, des gènes sont échangés entre organismes sans reproduction sexuelle. C'est la spécialité des bactéries, qui s'avèrent extraordinairement habiles à intégrer et à échanger de l'ADN entre elles.

Le transfert horizontal de gènes a soudainement fait son entrée dans le débat sur les plantes OGM à l'occasion de la controverse suscitée par les gènes de résistance aux antibiotiques, soit les gènes qui protègent un organisme contre l'effet nocif d'un antibiotique. Ces gènes sont de moins en moins utilisés dans le cadre du développement de plantes OGM en raison de leur connotation négative, alors qu'ils étaient abondamment utilisés à l'aube de la technologie OGM (dont les plantes OGM actuellement utilisées sont issues).

À l'époque, un gène de résistance aux antibiotiques était intégré avec le gène d'intérêt dans l'ADN des plantes afin de permettre une sélection efficace des plantes OGM en laboratoire parmi le vaste groupe de plantes OGM et non OGM. Mais les chercheurs se sont vite inquiétés de savoir si ces gènes de résistance aux antibiotiques contenus dans les plantes OGM pouvaient être transférés à des bactéries (ou d'autres organismes tels que des champignons) dans le sol, puisque ces gènes provenaient initialement de bactéries. Des dizaines d'études ont alors été effectuées en laboratoire et sur le terrain. On dénombre ainsi 59 études rien que la pour la période comprise entre 2002 et 2012. Il est apparu que la fréquence du transfert horizontal de gènes de plantes vers d'autres organismes (dont les bactéries) est extrêmement faible et n'a encore jamais pu être démontrée sur le terrain. Ce n'est que dans les conditions artificielles d'un laboratoire que l'on a observé le transfert, entre une plante et une bactérie, d'un fragment d'ADN très similaire dans la plante et dans la bactérie et selon une très faible fréquence (de 1 pour 10 000 à 1 pour 100 millions).

1.2. Effets indirects des PGM sur l'environnement

Si l'utilisation des produits phytosanitaires n'est pas réfléchi et que les produits utilisés ne sont pas alternés, le risque que les insectes, les champignons ou les mauvaises herbes etc, développent une résistance restera présent. Et dans ce cas-là, les mauvaises herbes subsisteront même après le traitement du champ et l'efficacité de la culture de la plante tolérante de l'herbicide régressera sensiblement. Exactement ce qui s'est passé aux états unis, moins de 10 ans après l'introduction de plantes tolérantes au glyphosate, les

La transgénèse végétale

premières mauvaises herbes tolérantes à cette substance ont commencé à voir le jour. Chose qui a mené à ce que les agriculteurs appliquent plus de glyphosate que les doses initialement nécessaires ou même utiliser d'anciens herbicides plus nocifs. Ainsi, l'avantage environnemental procuré par la culture du soja tolérant au glyphosate est passé de 21% en 2004 à seulement 1% en 2013.

a. Résistance au Bt

Tout comme les mauvaises herbes, les insectes peuvent également s'adapter aux produits phytosanitaires. Par exemple, la Chrysomèle des racines du maïs a ainsi pu s'adapter aux plantes Bt résistantes aux insectes et affaiblir l'efficacité de la rotation des cultures du maïs et du soja. Plusieurs expériences ont démontré que les insectes peuvent s'adapter relativement vite aux protéines Bt. Après une sélection de huit générations en 1990 il a été prouvé que le foreur de tiges européen pouvait développer une résistance à une plante Bt spécifique.

Plusieurs études ont démontré que les protéines insecticides secrétées par certaines plantes restent biologiquement actives pendant des mois dans le sol, et dans certains cas de froid, leur dégradation semble être quasiment nulle. Dans certains cas ces insecticides secrétés par la plante peuvent s'attaquer à des insectes qui sont eux-mêmes des ennemis naturels des insectes ravageurs des cultures. La production permanente d'insecticide par une culture de plantes *Bt* crée un nouveau milieu de sélection qui peut favoriser le développement de résistances chez les insectes.

2. Impact des PGM sur la santé

Les études indépendantes démontrant l'innocuité des cultures OGM sur la santé humaine ou animale sont cruellement absentes de la littérature scientifique. Quasiment tous les OGM commercialisés dans le monde produisent ou sont tolérants à des pesticides. Pourtant, alors que les pesticides doivent être testés pendant une période minimale de deux ans avant d'être autorisés en Europe, les tests de sécurité effectués sur les OGM n'ont jamais duré plus de 90 jours même pour les plantes OGM pesticides. En revanche nombreux chercheurs ont prouvé l'existence de liens forts entre la consommation indirecte (à travers la consommation d'animaux ayant ingéré des OGM) ou directe et les risques sur la santé. En fait, nous ignorons si les cultures OGM sont « réellement » sans danger pour la

La transgénèse végétale

consommation animale ou humaine car trop peu d'études à ce sujet ont été menées sur le long terme. Cela transparaît dans la controverse actuelle concernant l'évaluation de l'innocuité des OGM. Il est infondé et trompeur d'affirmer que consommer des OGM est sans danger pour la santé sous prétexte que les Américains en consomment depuis dix ans sans qu'on ait observé des conséquences visibles.

2.1. La toxicité

Plusieurs études ont démontré que des symptômes de toxicité peuvent, par exemple, apparaître sur les reins et le foie. En effet, cette toxicité peut provoquer l'apparition de maladies chroniques. De ce fait, les herbicides utilisés en association avec les cultures OGM comportent des risques avérés pour la santé humaine.

a. Plantes-insecticides (Bt) : devenir de l'insecticide dans la chaîne alimentaire

Il n'existe aucun suivi sanitaire systématique des animaux nourris avec des plantes Bt vu que Les insecticides produits dans les plantes *Bt* sont considérés non toxiques au prétexte qu'il s'agit de protéines et donc de molécules naturelles mais le caractère naturel d'une molécule, ou plus particulièrement le fait que ce soit une protéine, ne l'exonère en rien d'une éventuelle toxicité ou de graves effets secondaires. Par exemple, que l'agent infectieux responsable des maladies dégénératives du système nerveux central appelées encéphalopathies spongiformes (maladie de la vache folle, tremblante du mouton, maladie de Creutzfeldt-Jakob, ...), le prion, est une protéine.

Le débat sur le maïs pesticide Bt MON863 est né des inquiétudes exprimées par des scientifiques indépendants 40 au sujet de différences lors de tests alimentaires. Au lieu d'admettre les incertitudes concernant la sécurité alimentaire du MON863 et d'approfondir les recherches, l'EFSA et l'industrie des biotechnologies se sont évertuées à nier l'importance de ces découvertes.

2.2. Les allergies

En revanche, ce qui ne fait pas de doute, c'est que les cultures OGM peuvent potentiellement provoquer bien plus de réactions allergiques que les cultures issues de croisements conventionnels. Ainsi, lors d'une expérimentation à long terme menée en

La transgénèse végétale

Australie, il a été constaté que des petits pois OGM causaient des réactions allergiques chez les souris. Cela les rendait également plus sensibles à d'autres allergies alimentaires.

2.3. Les gènes marqueurs résistants aux antibiotiques

L'approbation d'aliments contenant des OGM est dotée de gènes marqueurs résistants aux antibiotiques, n'est pas encouragée. Cela s'explique par l'apparition dans l'organisme humain de bactéries résistantes aux antibiotiques. En 2008, une étude réalisée par l'Université de Vienne en Autriche, affirme que la 3^{ème} génération de souris nourries avec du maïs OGM de Monsanto, présentaient plus de difficultés à se reproduire. De plus, le nombre et le poids des petits étaient plus faibles. Les OGM sont devenus synonyme d'inquiétude à travers le Monde, même si les producteurs ont investi et dépensé des millions pour convaincre les consommateurs que les aliments à base d'OGM exposés sur le marché sont sans danger.

Références bibliographiques

- **ABNE. (2017)**. Promoteurs courants. [En ligne]. <http://nepad-abne.net/fr/biotechnologie/processus-delaboration-des-cultures-gm/promoteurs-courants/>.
- **Agnus, P. (2014)**. Le canon à ADN, une révolution dans le domaine de la transfection ?. [En ligne]. <http://www.indesciences.com/canon-adn-revolution-domaine-transfection/>.
- **Alem, C., El Hafiane, F., El Hamouri, B., & Ettalibi, M. (1995)**. Utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium rhizogenes* comme vecteurs de clonage d'un gènes dans la tomate et le tournesol. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires* 15(3), 5-14.
- **Alexender, Z. (2013)** Biotecnologie ambiental. [Présentation Powerpoint]. [En ligne]. <https://slideplayer.com/slide/571320/>.
- **Benabdoun, F. M. (2012)**. Etude moléculaire des étapes précoces de la symbiose actinorhizienne *Casuarina-Frankia*, analyse fonctionnelle des gènes de la plante hôte contrôlant l'infection. Thèse de doctorat. Université Constantine 1/Montpellier 2.
- **Biotech-ecolo. (2017)**. Transgénèse, génie génétique. [En ligne]. <http://www.biotech-ecolo.net/genetic-engineering/transgenese-genie-genetique.html>.
- **Boukaid, W. (2016)**. Les impacts multiples des OGM sur notre santé. [En ligne]. <https://www.agrimaroc.ma/les-impacts-multiples-des-ogm-sur-notre-sante/>.
- **Chandra, S. (2012)**. Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnology letters*, 34(3), 407-415.
- **Chimie-sup. (2017)**. Les OGM. [En ligne] <http://www.chimie-sup.fr/OGM.htm>.
- **Choi, H. J., Chandrasekhar, T., Lee, H. Y., & Kim, K. M. (2007)**. Production of herbicide-resistant transgenic sweet potato plants through *Agrobacterium tumefaciens* method. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91(3), 235-242.
- **Clive, J. (2011)**. État mondial des plantes GM commercialisées: 2011. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), ISAAA Briefs, no 43.
- **Crété, P. (2006)**. La trasgénèse vegetale : principes et applications. [Présentation Powerpoint] [En ligne] <https://slideplayer.fr/slide/9452221>.
- **Deleury et al. (2003)**. Pour une gestion éthique des ogm. La Commission de l'éthique de la science et de la technologie. Québec. Canada
- **Franche, C. (2013)**. La transgénèse végétale. Recueil inédit. Université des frères Mentouri-Constantine 1. Algérie.
- **Franche, C. (2014)**. La transgénèse végétale. Recueil inédit. Université des frères Mentouri-Constantine 1. Algérie.
- **Franche, C. & Duhoux, E. (2001)**. La transgénèse végétale. Nancy, France : Elsevier.
- **Galiana, A & Franche, C. (2004)**. La transformation génétique chez les arbres forestiers : principales stratégies utilisées et leurs applications. *Bois et forêts des tropiques*, N° 282 (4) : 55-66.

- **Gelvin, B.S. (2003).** *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(1): 16–3.
- **Gnis-pedagogie . (s.d).** suivre l'évolution continue de l'amélioration des plantes. [En ligne]. <https://www.gnis-pedagogie.org/>.
- **Greenpeace. (2008).** Impacts des OGM sur l'environnement et la santé : les preuves. Note de synthèse, 1-3.
- **Guimaraes, L.A., Pereira, B.M., Araujo, A.C.G., Guimaraes, P.M., & Brasileiro, A.C M. (2017).** *Ex vitro* hairy root induction in detached peanut leaves for plant–nematode interaction studies. *Plant methods*, 13(1), 25.
- **Hodgson, L. (2017).** L'origine du chou fleur orange. [En ligne]. <https://jardinierparesseux.com/2017/08/14/lorigine-du-chou-fleur-orange/>.
- **Horizonbiotechs. (s.d).** Les domaines d'application de la transgénèse. [En ligne]. <http://nepad-abne.net/fr/biotechnologie/processus-delaboration-des-cultures-gm/promoteurs-courants/>.
- **Hwang, H.H., Yu, M., & Lai, E.M. (2017).** *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. *Arabidopsis Book*. 2017;15:e0186.
- **Inf'OGM. (2014).** Qu'est-ce qu'un OGM ? Qu'est-ce que la transgénèse ?. [En ligne]. <https://www.infogm.org/faq-definition-OGM-transgenese>.
- **Inf'OGM. (2000).** Les OGM en quelques dates. [En ligne]. <https://www.infogm.org/Les-OGM-en-quelques-dates>.
- **INRP. (2002).** Applications et implications de la transgénèse. [En ligne]. <http://acces.ens-lyon.fr/biotic/biomol/enjeux/appligen/html/apliagro.htm>.
- **ISAAA. (2016).** Situation Mondiale des Plantes GM Commercialisées:2016 . No 52, 1-16.
- **James, C. (2011).** Global status of commercialized biotech/GM crops, 2011 (Vol. 44). Ithaca, NY: ISAAA. p 8.
- **Jo Bury, R.E. (2016).** Impact des plantes génétiquement modifiées sur l'environnement.VIB.
- **Kempf, V.A., Hitziger, N., Riess, T., Autenrieth, I.B. (2002).** Do plant and human pathogens have a common pathogenicity strategy? *Trends Microbiol.* 10:269–75
- **Le Dref, G. (2017).** Théories de l'évolution et biotechnologies : d'une controverse à l'autre. Thèse de doctorat. Université de strasbourg. France.
- **Lepniec, L. (2012).** Les biotechnologies végétales : création de biodiversité dans les génomes végétaux et amélioration des plantes. Séminaire biotechnologies : 9- 10 février 2012.
- **Leuzinger, K., Dent, M., Hurtado, J., Stahnke, J., Lai, H., Zhou, X., & Chen, Q. (2013).** Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. *J. Vis. Exp* (77).
- **Lièvre, K. (2004).** Modification de la composition en molécules pharmaceutiques (furocoumarines) de la Rue officinale (*Ruta graveolens*) par transformation génétique. Thèse de doctorat. Nancy, France.

- **Murakami, T., & Sunada, Y. (2011).** Plasmid DNA gene therapy by electroporation: principles and recent advances. *Current gene therapy*, 11(6), 447-456.
- **Ono, N.N., & Tian, L. (2011).** The multiplicity of hairy root cultures: prolific possibilities. *Plant science*, 180(3), 439-446.
- **Ouarts, A. (2004).** Contribution à l'étude des fonctions déterminées par l'ORF8 du T-DNA du plasmide Ri2659 d'*Agrobacterium rhizogenes*. Thèse de doctorat. Université de Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.
- **Pelletier, (2007).** Les méthodes génétiques de l'amélioration des plantes. Versailles, France.
- **Perrin, A. (2016).** OGM. [Présentation Powerpoint]. [En ligne]. <https://slideplayer.fr/slide/11995965/>.
- **Perrin, J.F. (2016).** Le Transfert de l'ADN-T, la transformation d'une cellule hôte, les conséquences. [En ligne]. http://www.perrin33.com/microbiologie/lereste/agrobacterium-ti_2.php/.
- **Planetoscope, (2017).** La production mondiale d'OGM. [En ligne]. <https://www.planetoscope.com/agriculture-alimentation/1761-production-mondiale-de-cultures-ogm.html>.
- **Roudier, F. (ed).** Présentation au sujet: "Exemples d'applications à l'étude du développement végétal. INRA, France.
- **Séralini, É., & Vélot, C. (2011).** Les OGM agricoles aujourd'hui: Que sont-ils et participent-ils à la faim dans le monde. *Écol. Politique*, (43) :23-34.
- **Sunilkumar, G., Campbell, L.A.M., Puckhaber, L., Stipanovic, R.D. & Rathore, K.S. (2006).** Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 18054–18059.
- **Thizeau, V., & Robaglia, C. (2001).** Transgénèse végétale : Les techniques de transfert de gènes chez les végétaux. [En ligne]. <http://acces.ens-lyon.fr/biotic/biomol/transgen/html/transveg.htm>.
- **Vigouroux, A. (2013).** Étude structurale de protéines périplasmiques d'*Agrobacterium tumefaciens* impliquées dans la virulence chez les plantes. Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études. Paris, France.
- **Vu, T.D. (2008).** Effets de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolite secondaires chez *Datura innoxia* Mill. Cultivé en conditions hors sol ; impact des facteurs biotiques et abiotiques. Thèse de doctorat. Université de Lorraine., France.
- **Weidner, M., & Furelaud, G. (2003).** La transgénèse grâce à *Agrobacterium tumefaciens*. [En ligne]. <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/cellules-et-molecules/la-transgenese-grace-a-agrobacterium-tumefaciens>.
- **Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., ... & Woo, L. (2001).** The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294(5550), 2317-2323.