

Exploiter la Diversité

Les êtres vivants possèdent, selon leurs conditions et modes de vie, des gènes leur donnant des aptitudes particulières.

Ces caractères peuvent être très intéressants pour de nombreuses espèces cultivées. Les domaines d'application sont également très vastes : l'agriculture, l'alimentation, l'industrie, la santé...

Les nouvelles techniques de biotechnologie permettent de franchir les limites de la reproduction sexuée entre espèces et d'exploiter l'immense diversité génétique du monde vivant.

1. L'INTRODUCTION DE NOUVEAUX CARACTÈRES

2. LE SAUVETAGE D'EMBRYONS INTERSPÉCIFIQUES

3. LA FUSION DE PROTOPLASTES

3.1. L'obtention de protoplastes

3.2. L'hybridation somatique

3.3.1. Les hybrides somatiques retenus

3.3.2. Une application de la fusion de protoplastes

4. LA TRANSGÉNÈSE

4.1. Le génie génétique

4.1.1. La transgénèse : différentes stratégies

4.2. Les étapes de la transgénèse

4.2.1. La réalisation de construction génétique

4.2.2. La multiplication de la construction génétique : le clonage

4.2.3. L'utilisation d'*Agrobacterium*

4.3. La transformation biologique

4.4. Le transfert direct

4.5. L'obtention d'une variété OGM

4.5.1. La caractérisation moléculaire des transformants

4.5.2. La caractérisation biochimique des transformants

5. LES DOMAINES D'APPLICATION DE LA TRANSGÉNÈSE

6. LA RÉGLEMENTATION SUR LES OGM

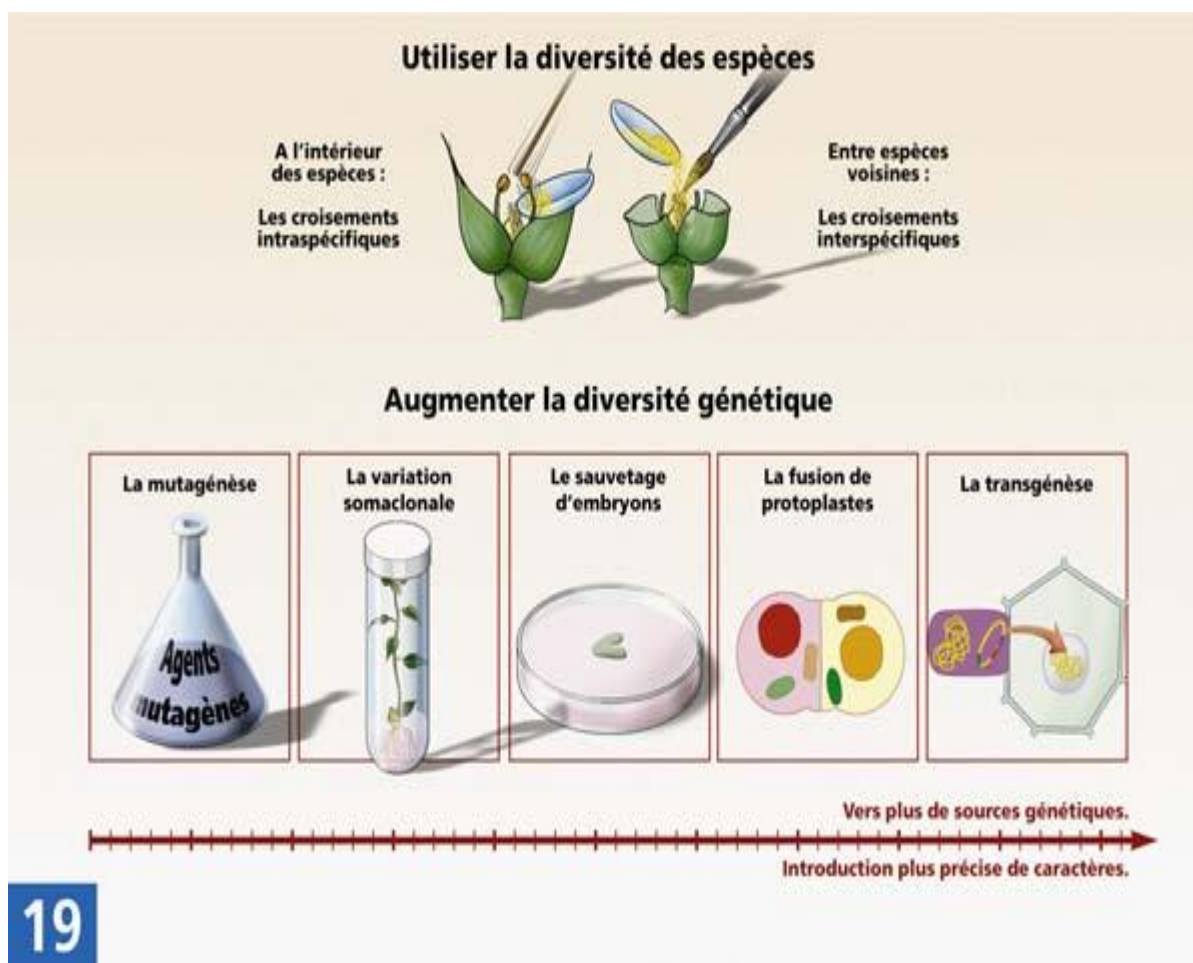
6.1. Les dispositifs d'évaluation et de contrôle des risques

6.2. Les démarches à suivre

6.3. La sécurité alimentaire et l'étiquetage

Exploiter la Diversité

1- L'introduction de nouveaux caractères



1.Utiliser la diversité de l'espèce et des espèces voisines

L'amélioration génétique d'une espèce cultivée repose sur l'exploration et l'utilisation de la diversité naturelle au sein de l'espèce afin d'associer des caractères intéressants. Toutefois, cette variabilité intraspécifique est limitée.

Ainsi, pour l'amélioration de caractères de résistance aux maladies, de rusticité, d'adaptation à certaines conditions de milieu, le sélectionneur a souvent recours à des croisements avec les formes sauvages voisines de l'espèce cultivée. Ces croisements interspécifiques sont utilisés chez des espèces comme le colza, le tournesol, le blé, la betterave, la tomate, le melon, le haricot, la laitue.... .

1.2. Augmenter l'accès à la diversité génétique

Parfois ces croisements se heurtent à des problèmes d'incompatibilité ou ne permettent pas toujours de travailler des caractères intéressants. Le sélectionneur dispose des techniques permettant de contourner ces difficultés :

- la mutagenèse et la variation somaclonale. Ces techniques sont peu utilisées car trop aléatoires,
- le sauvetage d'embryons interspécifiques. Cette technique permet d'élargir les croisements avec des espèces apparentées,
- la fusion de protoplastes. Cette technique permet la fusion de cellules entre des espèces plus éloignées,
- la transgénèse. Elle a pour but d'introduire dans une plante une information génétique définie, provenant d'espèces, de genres ou de règnes différents.

D'une technique à l'autre, de la mutagenèse à la transgénèse, le sélectionneur augmente la source des caractères transmissibles aux plantes en cherchant des gènes chez les êtres vivants de plus en plus éloignés génétiquement de l'espèce à améliorer, tout en introduisant ces caractères de façon plus précise.

**** La mutagenèse**

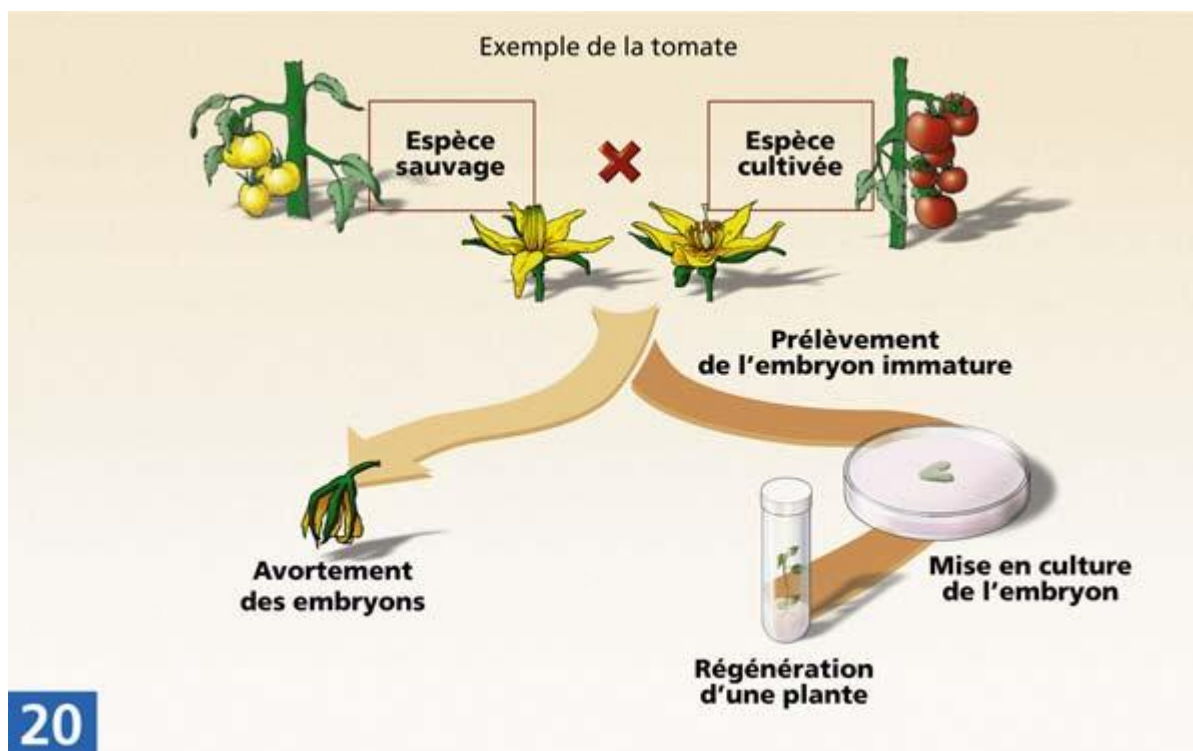
La mutagenèse consiste à provoquer artificiellement des modifications de l'ADN en utilisant des agents mutagènes : produits chimiques ou rayonnements ionisants.

Les principaux succès de cette méthode concernent l'amélioration des plantes autogames. Ainsi chez le riz, une amélioration de la qualité technique du grain a pu être obtenue.

**** la variation soma clonale**

La variation somaclonale est la modification observée chez certaines cellules, après un long cycle de cultures *in vitro* sans régénération. Elles ne sont plus alors identiques à la plante mère. Cette variation peut être due à une modification du génome nucléaire ou du génome des organites cytoplasmiques. Par cette méthode, on a pu obtenir une variabilité pour des caractères tels que la résistance aux herbicides, la résistance aux maladies, la tolérance au stress ou à la salinité.

2. Le sauvetage d'embryons interspécifiques



Lors de croisements interspécifiques, des barrières naturelles empêchent le développement complet de l'embryon. Pour remédier à cette situation, on pratique après fécondation un prélèvement précoce des embryons pour les mettre en culture sur un milieu artificiel nutritif. Cette technique de culture *in vitro* est appelée sauvetage d'embryons interspécifiques.

2.1. La technique de sauvetage d'embryon

L'avortement d'embryons issus de croisements interspécifiques est attribué à un développement retardé de l'albumen, par incompatibilité entre les tissus embryonnaires et maternels. La récupération de l'embryon doit être effectuée avant son avortement, entre 4 et 16 jours après la fécondation, selon les espèces. Il est souvent nécessaire de réaliser ce prélèvement sous une loupe binoculaire. C'est pourquoi on cherche à retarder cette opération pour disposer de matériel végétal plus facilement manipulable.

Les graines immatures sont désinfectées en surface et après dissection, les embryons sont transférés sur un milieu de culture solide approprié. Après deux semaines, les embryons ont généralement atteint le stade cotylédonaire.

Le transfert sur un milieu riche en hormones de croissance permet la production de plantes.

2.2. Exemple de la tomate

La tomate cultivée, *Lycopersicon esculentum*, du fait de son autogamie, possède une variabilité génétique faible. En revanche, les tomates sauvages possèdent de nombreux gènes de résistance aux maladies notamment l'espèce *Lycopersicon peruvianum*. Les barrières d'incompatibilité avec les espèces sauvages génétiquement les plus éloignées de la tomate cultivée ne peuvent être contournées que grâce au sauvetage d'embryons.

L'embryon est prélevé avant la phase de maturation de la graine.

Il est ensuite transplanté et cultivé sur un milieu artificiel riche en sucre, permettant la régénération d'une plante nouvelle. L'hybride obtenu est souvent croisé par le parent de l'espèce cultivée (rétrocroisement) et sa descendance est sélectionnée, pour fixer des caractères nouveaux et intéressants, tout en éliminant les caractères indésirables issus de l'espèce sauvage.

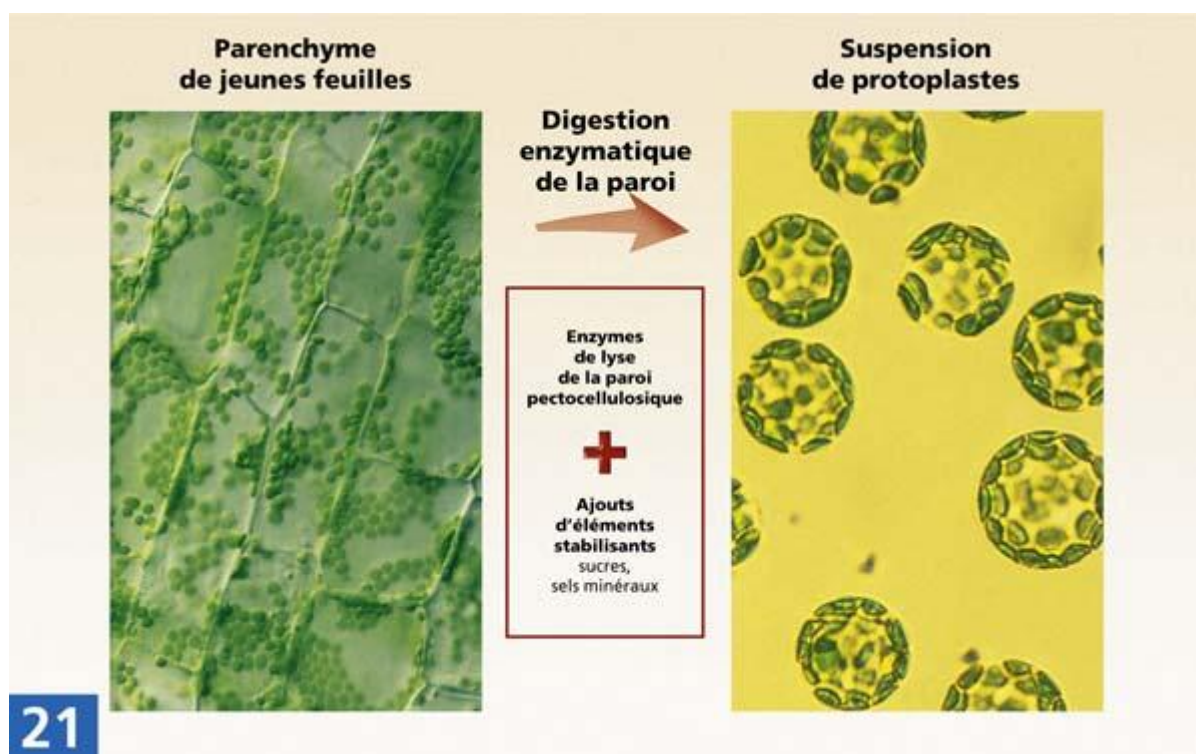
2.3. Autres exemples d'application

- **La courgette** est une espèce fortement attaquée par l'oïdium, les virus de la mosaïque du concombre et de la mosaïque de la pastèque. Les variétés cultivées, *Cucurbita pepo*, sont insuffisamment résistantes à ces parasites. Des croisements avec des espèces sauvages américaines résistantes, *Cucurbita okechobeensis* et *Cucurbita ecuadorensis*, ont été réalisés grâce au sauvetage des embryons immatures, rendant ainsi possible l'amélioration de la résistance aux maladies des variétés cultivées.

- **La laitue**, *Lactuca sativa*, est une espèce sensible au brémia. Le croisement avec deux espèces sauvages, *Lactuca virosa* et *Lactuca saligna*, possédant des gènes de résistance intéressants est difficile à réaliser. Le sauvetage d'embryons interspécifiques a permis d'augmenter considérablement la réussite de ces croisements.

Lors de croisements interspécifiques, des barrières naturelles empêchent le développement complet de l'embryon. Pour remédier à cette situation, on pratique après fécondation un prélèvement précoce des embryons pour les mettre en culture sur un milieu artificiel nutritif. Cette technique de culture *in vitro* est appelée sauvetage d'embryons interspécifiques.

3. La fusion de protoplastes



3.1. L'obtention des protoplastes

La présence de la paroi pectocellulosique des cellules est une des barrières aux échanges d'information génétique. On peut séparer les cellules d'un tissu végétal grâce à l'action d'enzymes généralement extraites de champignons, qui dégradent la cellulose et les matières pectiques de la paroi. Des agents stabilisants sont ajoutés au milieu pour empêcher l'éclatement de la cellule. On obtient ainsi des cellules « déshabillées », qui deviennent sphériques : les protoplastes. Ces derniers peuvent être obtenus à partir de n'importe quel tissu végétal, mais ce sont généralement les parenchymes des jeunes feuilles qui sont utilisés pour leur préparation.

A partir de ces protoplastes, il est possible d'obtenir de nouvelles plantes. Si les conditions de milieu sont favorables, la paroi végétale se reconstitue. Les organites cellulaires se réarrangent et les cellules entrent en division. Elles donnent ainsi naissance à des microcolonies, puis des cals, amas de cellules indifférenciées. Transférés sur un milieu de régénération, les cals se développent en embryons somatiques qui donneront des plantules.

S'il est apparemment possible d'obtenir des protoplastes chez toutes les espèces végétales, leur culture puis la régénération d'une plante entière à partir des protoplastes posent encore de nombreuses difficultés et constituent une limite de cette technique. Il semble notamment que les

monocotylédones soient plus récalcitrantes vis-à-vis de la culture des protoplastes que les dicotylédones.

**** Applications**

- L'hybridation somatique. La propriété la plus importante des protoplastes est leur capacité à fusionner entre eux lorsqu'ils sont placés dans un milieu approprié. Cette technique permet de surmonter les barrières liées à la reproduction sexuée et de créer de nouvelles combinaisons entre noyau et cytoplasme.

- La transformation génétique. Du fait de l'absence de la paroi pectocellulosique,

**** Les agents stabilisants**

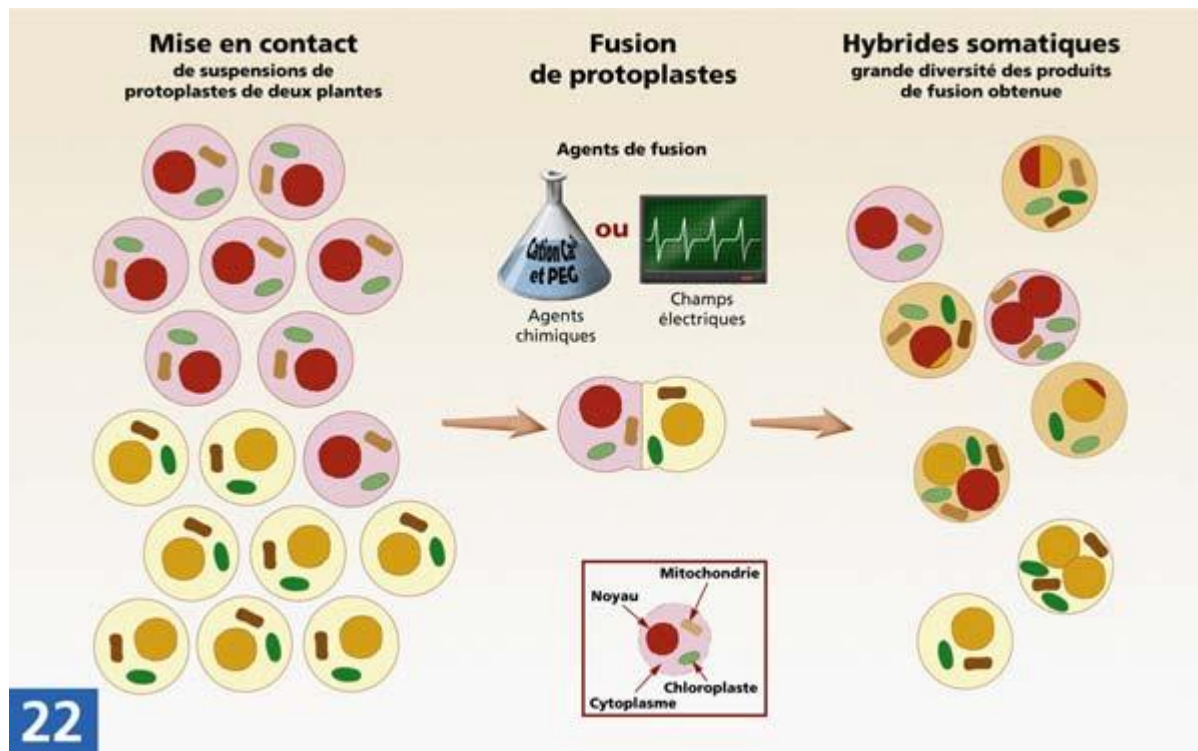
Ordinairement, l'appel d'eau provoqué par le potentiel osmotique de la vacuole de la cellule est contrebalancé par la paroi végétale. La suppression de la paroi doit donc être compensée par l'adjonction dans le milieu d'agents plasmolysants, qui abaissent le potentiel osmotique, tels que des sucres ou des sels minéraux en concentrations déterminées.

**** Les techniques de fusion de protoplastes**

- La fusion par des méthodes chimiques. On peut neutraliser la charge électrique des protoplastes par des cations Ca^{2+} et un pH élevé. Ensuite, on utilise le polyéthylène glycol (PEG) qui provoque une forte agrégation des cellules et déstabilise la membrane plasmique. Après retour aux conditions initiales, les protoplastes fusionnent.

- La fusion par des méthodes électriques. Cette technique, l'électrofusion, plus récente, utilise des champs électriques intenses et de courte durée, qui en déstabilisant les membranes entraînent la fusion des protoplastes. Ce système semble être plus efficace. L'introduction directe de l'ADN dans les cellules est facilitée.

3.2. L'hybridation somatique



Au cours de la reproduction sexuée, les informations génétiques contenues dans le cytoplasme sont transmises par la mère. En revanche, la fusion de protoplastes conduit à une hybridation des noyaux, mais aussi à celle des cytoplasmes. Ceci est très intéressant pour le transfert et l'amélioration de caractères à hérédité cytoplasmique, comme la stérilité mâle. On parle d'hybridation somatique (car issue de cellules non reproductrices de la plante, *Soma* = corps). Les protoplastes sont des cellules chargées négativement et la fusion spontanée n'est que très rarement observée. La fusion est obtenue sous l'action de divers agents chimiques ou d'un choc électrique.

La dernière étape consiste à induire la division des cellules. Elle aboutit à la formation de cals. Ensuite, la différenciation des tissus est provoquée pour reformer une plante entière. Les travaux de sélection commencent sur la descendance de l'hybride somatique.

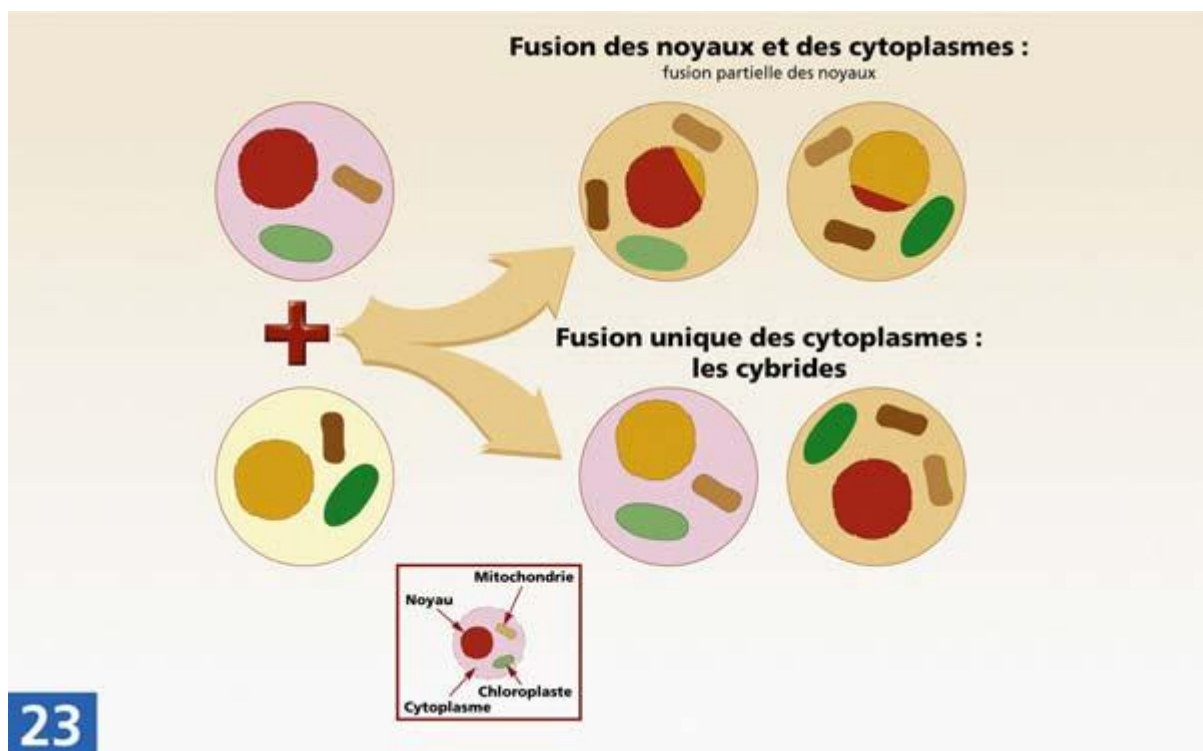
** Applications pratiques

- La première démonstration de fusion entre des protoplastes différents remonte aux travaux de Melchers *et al.*, en 1978. Il recherchait des tomates cultivables à basse température et réalisa, à cette fin, des hybrides entre la tomate et la pomme de terre par fusion de protoplastes : la pomate. Cette nouvelle espèce est malheureusement un exemple théorique, car elle est stérile.

- La pomme de terre cultivée, *Solanum tuberosum*, est une espèce chez laquelle l'introduction de caractères par fusion de protoplastes est facilement réalisable. Ainsi, on a pu introduire des gènes de résistance au virus de l'enroulement, aux virus Y et X, au mildiou et à la pourriture bactérienne due à *Erwinia*, à partir des espèces sauvages d'Amérique du Sud, notamment *Solanum brevidens*.

- De nouvelles lignées mâles stériles de colza résistantes à l'atrazine ont pu également être obtenues par cette technique.

3.2.1. Les hybrides somatiques retenus



Lors de la fusion, tous les échanges sont possibles entre deux protoplastes. On peut ainsi obtenir des degrés de fusion très variables :

3.2.1.1. Fusion des noyaux et des cytoplasmes

Lorsque la fusion des noyaux a lieu, il peut y avoir une recombinaison plus ou moins importante entre les chromosomes des deux parents. Ce phénomène peut être utilisé pour transférer des gènes nucléaires.

On cherchera notamment à obtenir des hybrides somatiques asymétriques, où seuls quelques

fragments d'ADN du parent donneur seront introduits dans l'espèce receveuse. En effet, les cas de fusion importante de génomes entre espèces conduisent à des plantes souvent stériles comme la tomate. Pour favoriser ce transfert partiel, l'ADN du parent donneur est déstabilisé par irradiation ménagée des protoplastes (rayons X ou Y) avant la fusion.

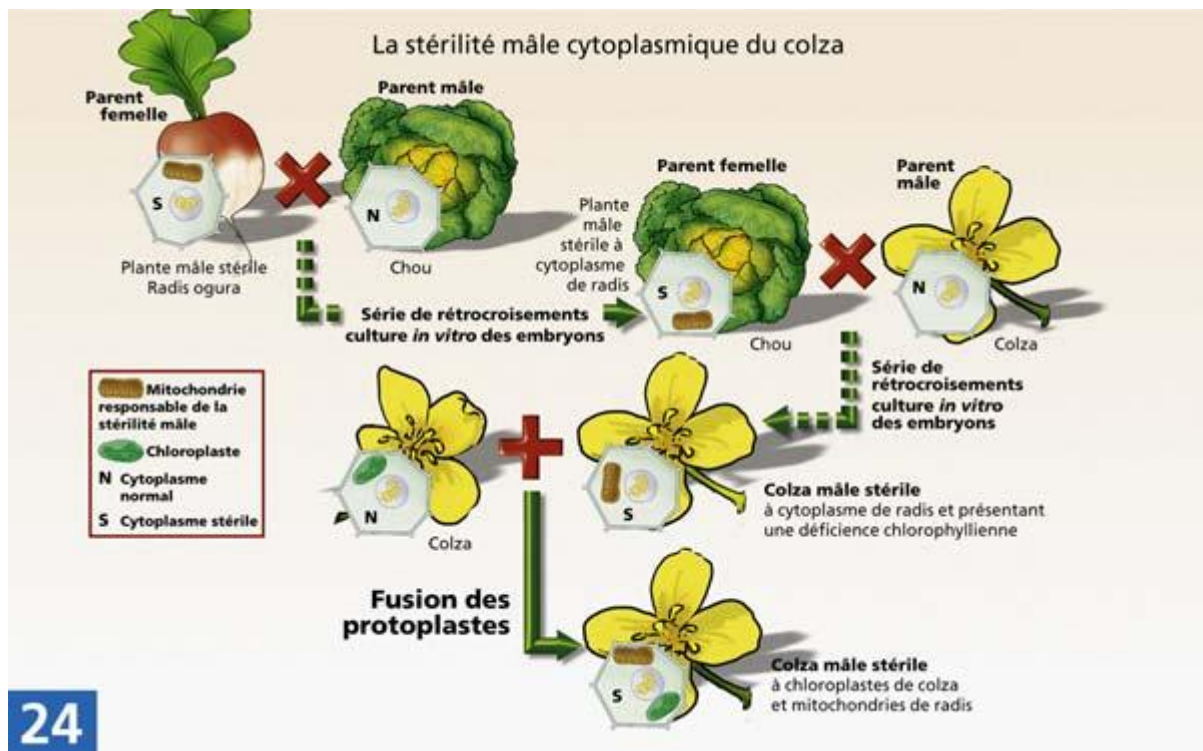
3.2.1.2. Fusion unique des cytoplasmes : les cybrides

Très souvent, la fusion des noyaux n'a pas lieu et au cours des divisions successives, il ne subsistera que l'un des noyaux parentaux. Celui-ci sera associé à un cytoplasme composite ou recombiné. Il contient les organites cytoplasmiques de l'un ou l'autre parent.

On constate souvent une recombinaison des mitochondries. En revanche, les chloroplastes de l'un des deux parents sont souvent éliminés. Il y a alors modification des relations nucléo-cytoplasmiques. L'obtention de ces cybrides peut être également provoquée.

On utilise dans ce cas des doses létales d'irradiation pour les cellules du parent donneur, afin d'inactiver complètement le noyau. Seuls seront transférés ses mitochondries et ses chloroplastes. Le parent receveur peut en plus être traité à l'iodo-acétate, entraînant le blocage de ses organites. Ainsi, les cybrides issus de la fusion seront constitués du noyau du parent receveur et des organites du parent donneur. Les caractères sous la dépendance de l'ADN mitochondrial ou chloroplastique ne sont pas à négliger. Ainsi, la stérilité mâle cytoplasmique est un caractère résultant de l'interaction noyau-mitochondrie. On peut citer également la résistance aux herbicides qui est codée par l'ADN chloroplastique.

3.2.2. Une application de la fusion de protoplastes



3.2.2.1. Une application de la fusion de protoplastes

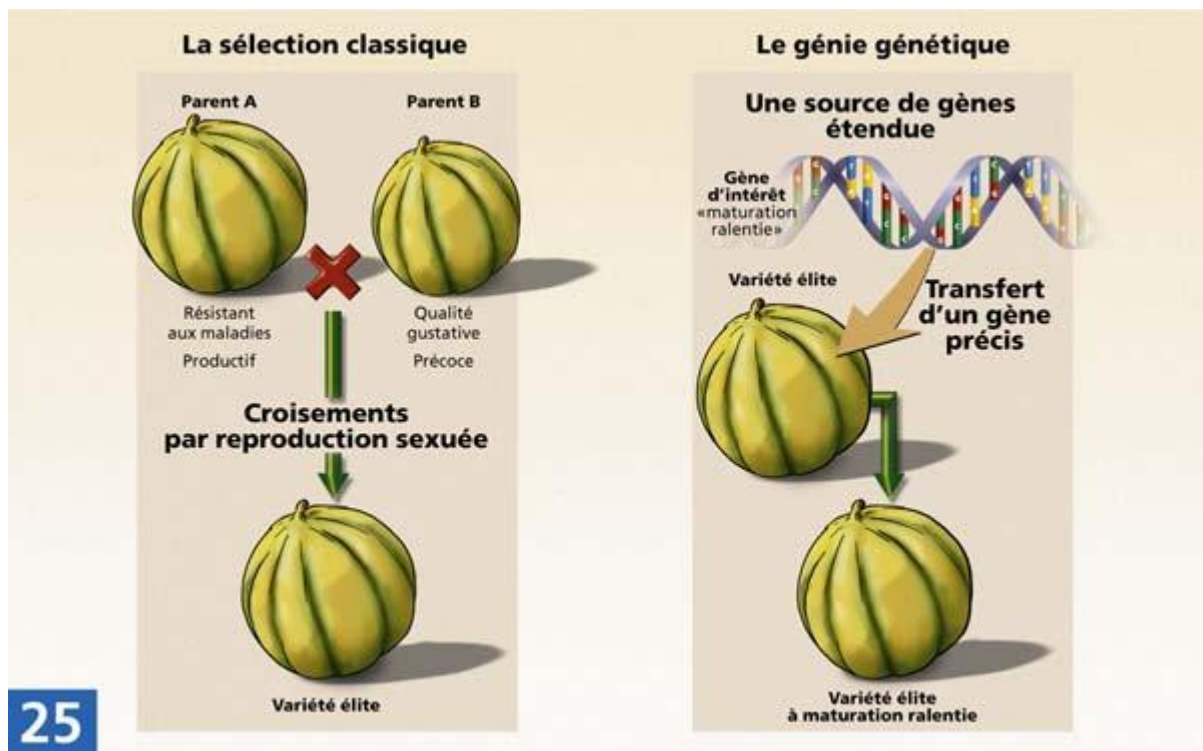
Le colza *Brassica napus* est issu d'un croisement naturel entre la navette *B. campestris* et le chou *B. oleracea*. L'espèce *Brassica napus* présente un fort hétérosis. Ainsi, il est apparu nécessaire de modifier la biologie florale, afin de mieux contrôler la reproduction sexuée, en vue de l'obtention de l'hybride. Des travaux ont été engagés sur la mise au point d'un système de stérilité mâle cytoplasmique. Chez une variété de radis japonaise, il a été découvert par Ogura en 1968 une stérilité mâle spontanée, contrôlée par le cytoplasme. Les chercheurs ont alors supposé qu'une plante qui aurait le noyau, les chloroplastes du colza, et les mitochondries du radis serait un colza mâle stérile. Pour obtenir ce colza, des techniques de fusion de protoplastes ont été mises en œuvre. Ceci s'est déroulé en deux étapes :

- Introduction dans le colza de la stérilité mâle du radis par voie sexuée. La stérilité mâle du radis, introduite au départ dans le chou, a été transférée ensuite dans le colza par une série de

rétrocroisements. On dispose ainsi de colzas mâles stériles, à cytoplasme de radis Ogura. Toutefois, les plantes obtenues présentaient des défauts de verdissement et une absence de nectaires nécessaires à une pollinisation réalisée presque exclusivement par les abeilles du fait de l'absence de chloroplastes dans le colza obtenu.

- Fusion de protoplastes entre ces hybrides et des colzas normaux. Elle a été réalisée en vue de sélectionner des régénérants à chloroplastes de colza, mais ayant des mitochondries recombinées, responsables de la stérilité mâle cytoplasmique.

4. La transgénèse



4.1. Le génie génétique

Le génie génétique désigne l'ensemble des techniques permettant d'introduire et de faire exprimer dans un organisme vivant un ou des gènes provenant de n'importe quel autre organisme. Les organismes ainsi obtenus sont dits Organismes Génétiquement Modifiés (OGM). On distingue les techniques de biologie moléculaire qui permettent de préparer les séquences d'ADN qui seront introduites, on parle de construction génétique, et les techniques de transgénèse qui permettent de transférer le gène. Plusieurs découvertes scientifiques ont permis d'aboutir à l'obtention de la première plante transgénique en 1983. La compréhension des mécanismes responsables de la galle du collet, maladie connue depuis l'antiquité, a permis la mise en évidence d'un transfert génétique naturel. Elle est à l'origine des techniques de transformation génétique utilisées aujourd'hui. La transgénèse permet d'apporter des solutions à des problèmes très variés.

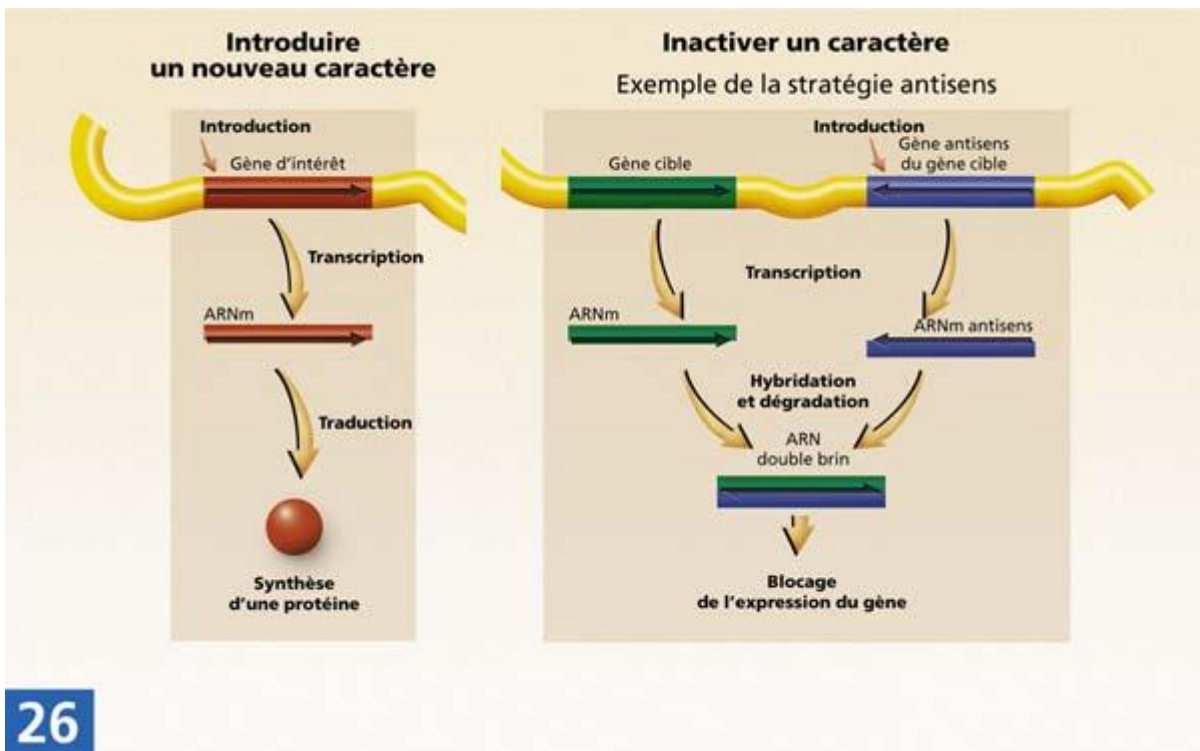
Ils touchent aussi bien l'agriculture, l'amélioration des qualités alimentaires, la santé, l'industrie ou l'environnement. Ce chapitre montre la diversité des espèces concernées et donne un aperçu des améliorations possibles.

Les deux principales caractéristiques du génie génétique en comparaison de la sélection classique basée sur la reproduction sexuée sont :

- Une source de gènes étendue. On peut franchir la barrière des espèces, des genres et des règnes. Ainsi, il est possible d'introduire des caractères qu'il ne serait pas possible d'introduire par sélection classique.

- Le transfert d'un gène précis. Elle permet de transférer le seul gène désiré et non de transférer plusieurs gènes comme lors de la reproduction sexuée.

4.1.1. La transgénèse: différentes stratégies



Introduire un nouveau caractère

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

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

Inactiver un caractère

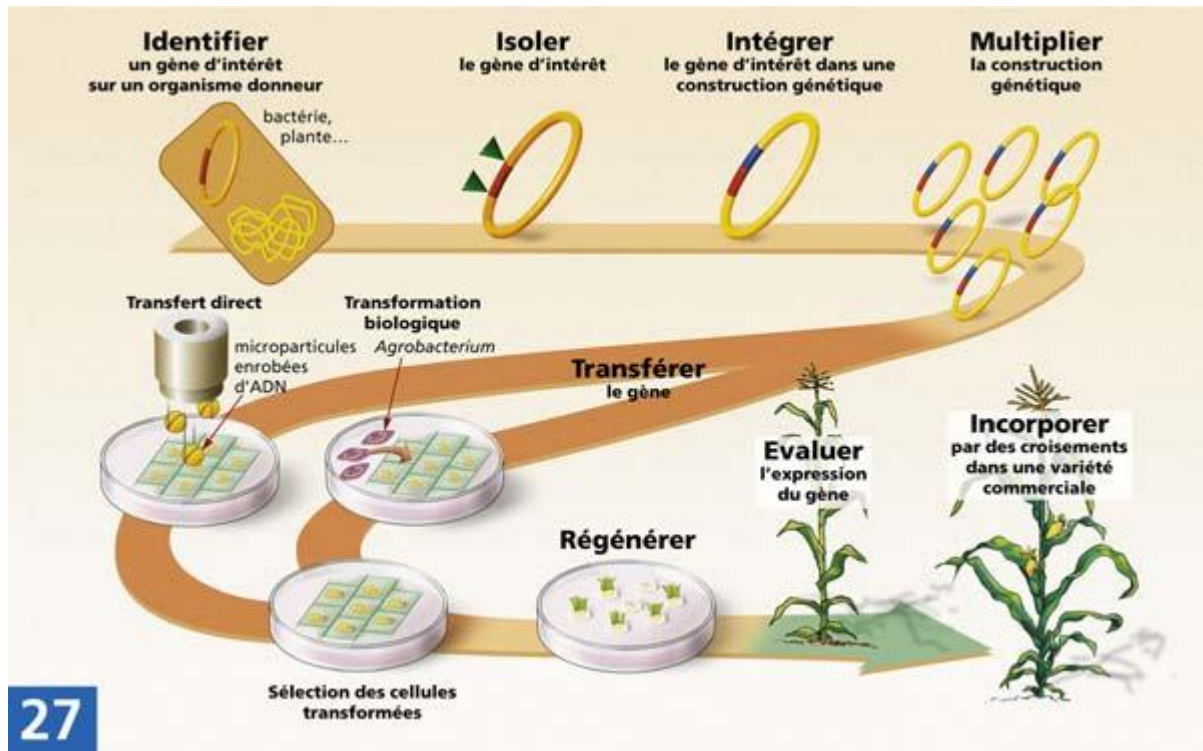
Dans ce cas, il n'y a plus à proprement parler de transfert de gènes, on agit sur l'expression d'un gène déjà présent dans la plante.

La **stratégie antisens** est la voie la plus couramment utilisée.

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

Deux autres techniques permettent également d'inactiver un caractère. L'une repose sur l'introduction dans la plante d'un gène codant pour un ribozyme. Ce sont des molécules d'ARN enzymatiques. Ces molécules d'ARN synthétisées possèdent une séquence complémentaire de l'ARN messager du gène cible à inactiver, le ribozyme s'hybride à cet ARN messager et coupe spécifiquement l'ARN. Dans ce cas également, le caractère ne s'exprime pas.

4.2. Les étapes de la transgénèse



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

La première étape est l'identification d'un caractère que l'on veut introduire dans la plante, comme par exemple des caractères de qualité nutritionnelle, la résistance à certains insectes, à certaines maladies, à des herbicides, etc. Le gène d'intérêt peut provenir de tout organisme vivant, plante, animal ou bactérie puisque le code génétique est universel. Il doit ensuite être isolé de l'organisme donneur. Il est intégré dans une construction génétique associant souvent un gène marqueur. Ce gène marqueur permet de sélectionner les cellules qui ont intégré le gène d'intérêt. La construction est ensuite multipliée (clonée) afin de disposer d'une quantité suffisante d'ADN pour son introduction dans les cellules végétales que l'on veut transformer.

Etape 2 : Transférer le gène

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

- La transformation biologique.

Cette technique utilise une bactérie du sol, *Agrobacterium*, qui a la propriété de réaliser naturellement la transformation génétique d'une plante, afin de la parasiter. Ainsi, une construction génétique introduite dans la bactérie (rendue avirulente au préalable) sera transférée dans la plante

et intégrée à son génome. C'est la technique la plus couramment utilisée.

- **Le transfert direct.**

Cette technique fait intervenir :

- soit une projection d'ADN dans les cellules de la plante par l'utilisation d'un canon à particules qui projette dans les cellules des microparticules enrobées d'ADN (biolistique),
- soit l'introduction d'ADN dans des protoplastes, par action d'un agent chimique ou d'un champ électrique (électroporation).

Les cellules issues de différents types de tissus végétaux peuvent être soumises à la transformation. Selon les espèces, ce seront des disques foliaires, des sections de tige, des cotylédons, des embryons, des microspores ou des protoplastes. Par exemple, chez le tabac et la tomate, on utilise des disques foliaires ; chez la pomme de terre, la transformation génétique peut se faire sur des protoplastes.

Etape 3 : Régénérer et évaluer les plantes transformées

Après sélection des cellules transformées, il faut régénérer les nouvelles plantes transgéniques. Les cellules transformées se développent d'abord en cals, larges amas de cellules indifférenciées. Après quelques semaines, on observe le développement de pousses. Elles sont alors placées dans un nouveau milieu de culture permettant le développement des racines. Quand les racines sont suffisamment développées, les plantules sont repiquées en pot et acclimatées en serre. La régénération *in vitro* des cellules transformées est une étape difficile à maîtriser. Aussi, le génotype, le type de tissus et les conditions de culture sont choisis en fonction de leur aptitude à la régénération.

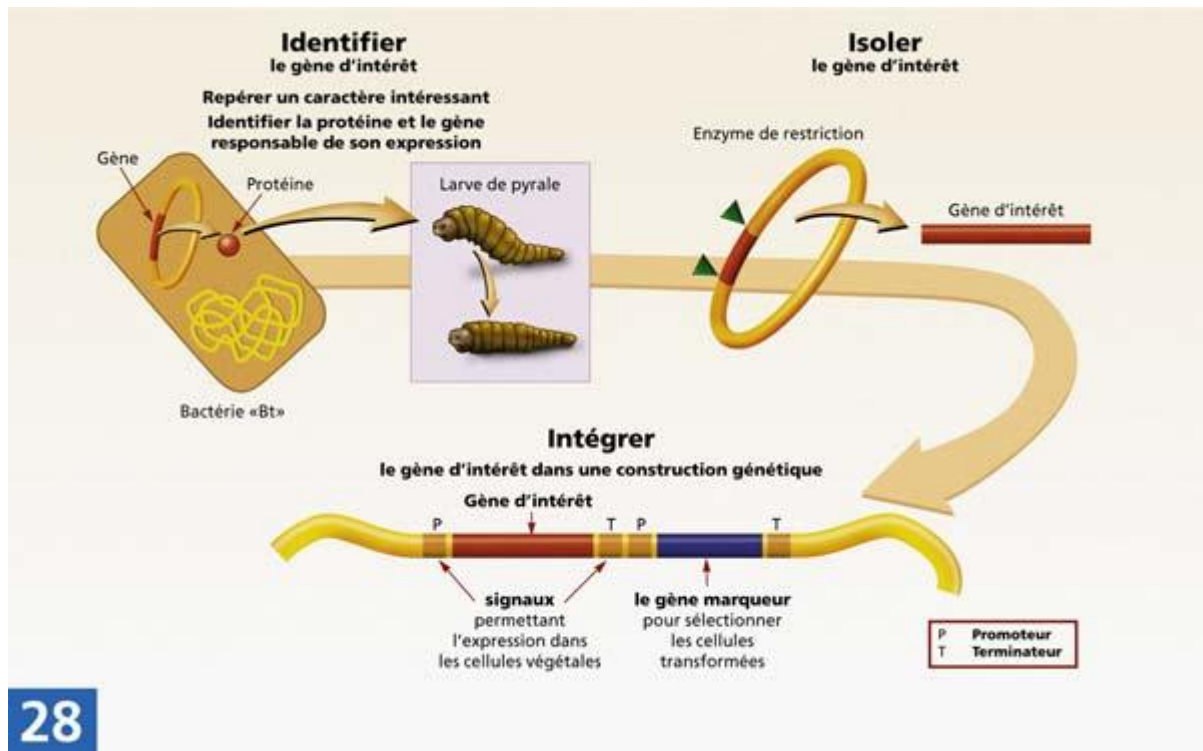
Les plantes régénérées sont ensuite analysées pour confirmer l'insertion de la construction génétique dans leur génome. Des analyses moléculaires sont conduites dans ce sens. Des études sur l'expression du gène ont lieu à plusieurs stades, ce qui permet de caractériser le niveau d'expression et le comportement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

Etape 4 : Incorporer dans une variété commerciale

Les plantes transformées obtenues sont soumises à des croisements contrôlés pour étudier les modalités de transmission du nouveau caractère à la descendance. La transformation et la régénération étant des opérations délicates, le génotype de la plante choisie est celui facilitant ces étapes. C'est pourquoi les plantes retenues sont ensuite soumises à une

succession de rétrocroisements afin d'introduire le gène dans le matériel élite et d'obtenir de nouvelles variétés commerciales exprimant ce caractère.

4.2.1. La réalisation de la construction génétique



28

Identifier et isoler le gène d'intérêt

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

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

C'est ce gène d'intérêt qui a ensuite été isolé à l'aide d'enzymes de restriction.

Intégrer le gène d'intérêt dans une construction génétique

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

- Les signaux

Il est nécessaire de lui ajouter des signaux de régulation. La présence d'un promoteur devant la séquence codante du gène d'intérêt est indispensable. C'est une séquence située en amont du gène, responsable de la transcription de l'ADN.

Une séquence terminateur est également indispensable. Située en aval, elle signale la fin de la séquence codante.

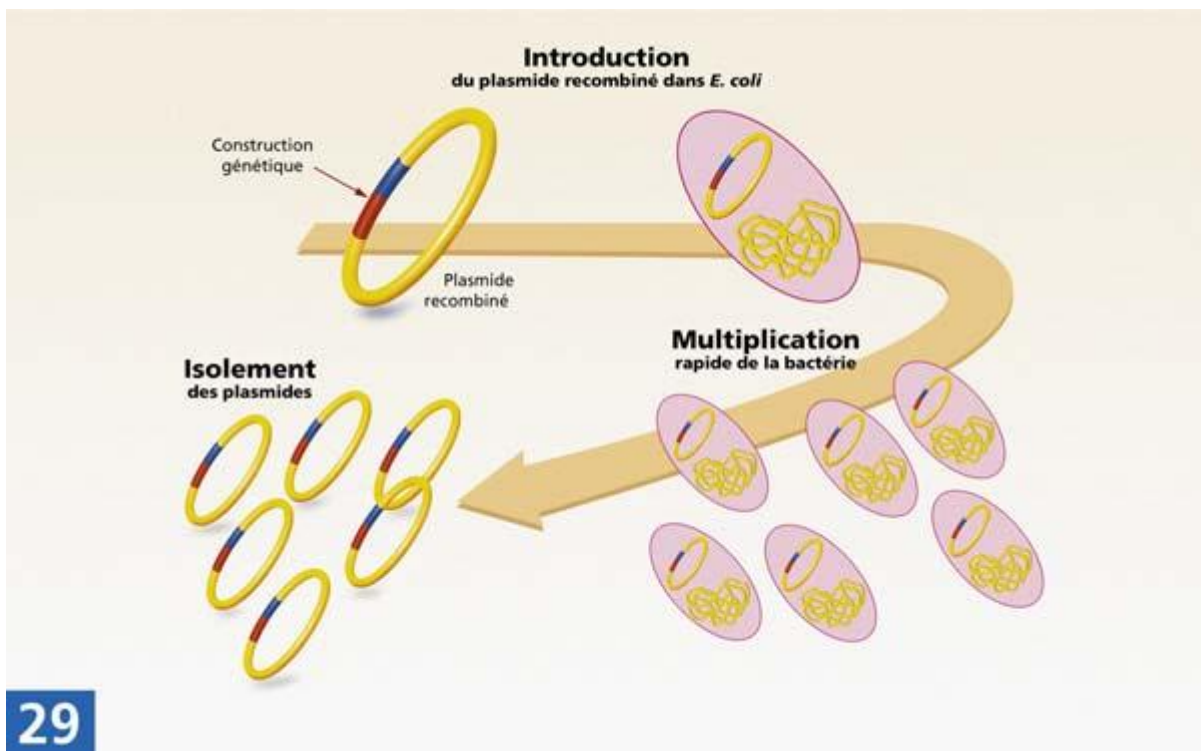
D'autres séquences peuvent être ajoutées. Elles permettent de cibler le lieu d'accumulation du produit du gène dans la plante, et de réguler la force de son expression.

- Les gènes marqueurs

Les gènes marqueurs permettent de repérer et de sélectionner, au cours des étapes suivantes de la transformation génétique, les cellules ayant intégré le gène d'intérêt. Il peut s'agir de gènes marqueurs de résistance à des antibiotiques ou à des herbicides. Les cellules transgéniques sont alors sélectionnées par l'expression de leur résistance dans un milieu contenant l'antibiotique ou l'herbicide.

Tous ces fragments de gènes d'origines différentes, gènes d'intérêt, gènes marqueurs et signaux, sont assemblés *in vitro*. On obtient ainsi la construction génétique qui est multipliée puis utilisée pour l'étape de transformation.

4.2.2. La multiplication de la construction génétique : le clonage



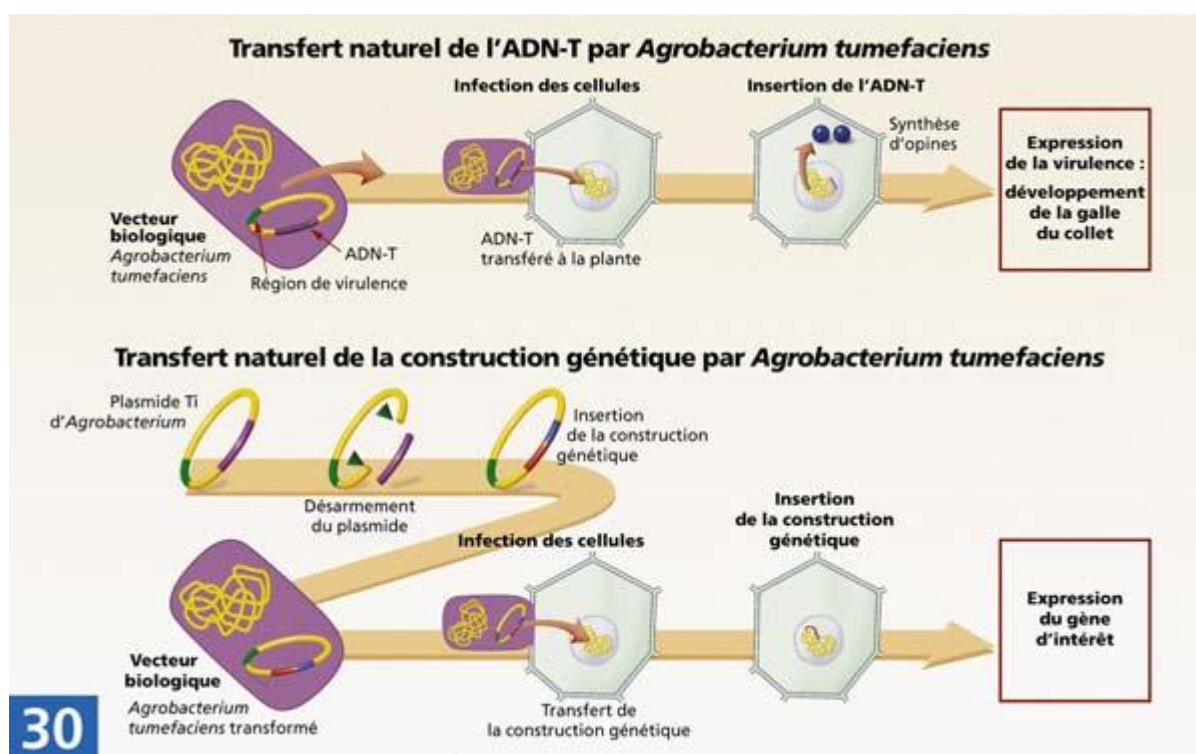
29

Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaires présentes chez les bactéries, en plus de leur unique chromosome. Ils sont utilisés pour héberger la construction génétique, car il est

relativement facile de travailler sur cette petite molécule d'ADN circulaire, qui possède de nombreux sites de restriction. C'est alors un plasmide recombiné.

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

4.2.3. L'utilisation d'Agrobactérium



La bactérie du sol, *Agrobacterium tumefaciens*, provoque chez les plantes infectées une tumeur, la galle du collet.

Une autre espèce, *Agrobacterium rhizogenes*, parasite également les plantes selon les mêmes mécanismes qu'*A. tumefaciens*.

Elle provoque alors le développement anarchique du système racinaire appelé chevelu racinaire.

Transfert naturel de l'ADN-T par *Agrobacterium tumefaciens*

On a pu démontrer que le parasitisme d'*Agrobacterium* repose sur le transfert d'une partie de son plasmide dans les chromosomes de la plante. Cette partie qui est transmise au génome de la plante est appelée ADN-T.

Il s'agit d'une partie constante de l'ADN du plasmide de la bactérie, appelé ADN-T, pour ADN Transféré. L'ADN-T est délimité par des bordures, bordure gauche et bordure droite, constituées par des séquences de 25 nucléotides. C'est la région comprise entre ces frontières 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 par production d'hormones de croissance.

Des gènes entraînant la synthèse d'opines sont également présents sur l'ADN-T. Les opines 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.

Sur le plasmide, en dehors de l'ADN-T, on trouve une région de virulence. Cette dernière n'entraîne pas directement la formation de la maladie, mais est indispensable au transfert et à l'intégration de l'ADN-T.

Transfert naturel de la construction génétique par *Agrobacterium tumefaciens*

C'est ce transfert naturel ou biologique de gènes, à l'aide d'*Agrobacterium*, qui est utilisé pour transformer les végétaux. *A. tumefaciens* est la bactérie la plus employée. Le principe est de modifier son plasmide Ti afin qu'il n'y ait pas de formation de la galle du collet, mais qu'il y ait quand même transfert et intégration des gènes désirés dans le génome des plantes.

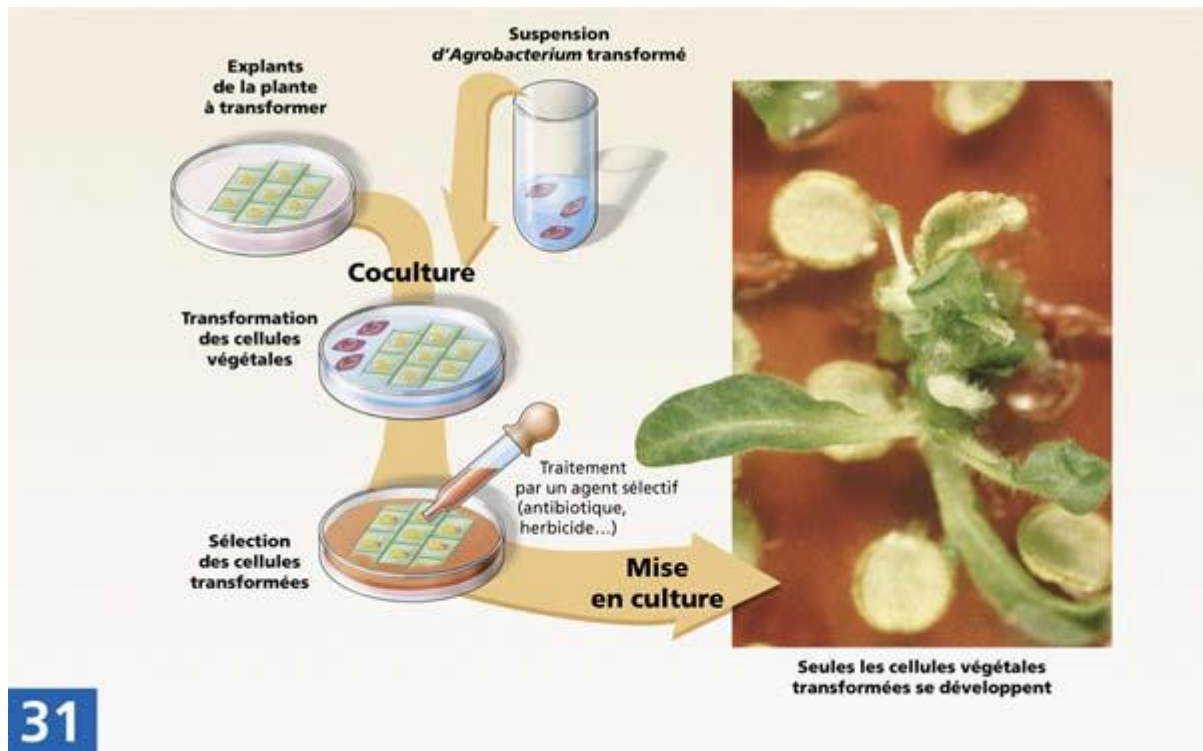
On construit des plasmides Ti désarmés. C'est-à-dire que les gènes, situés sur l'ADN-T, responsables du pouvoir pathogène de la bactérie, sont délétés. Il est toutefois nécessaire, pour la réalisation du transfert de gènes, de garder intactes les deux bordures gauche et droite de l'ADN-T, ainsi que les fonctions de virulence. Entre les deux bordures de l'ADN-T est insérée la construction génétique. Elle est ensuite introduite dans le végétal.

Les systèmes binaires de transfert

Des constructions ont été réalisées pour diminuer la taille des plasmides et pour simplifier les méthodes d'insertion de gènes dans l'ADN-T. Ainsi, l'information génétique, nécessaire au transfert et à l'intégration dans le matériel végétal de la construction génétique, a été répartie en deux plasmides. L'un est le plasmide d'Agrobacterium sans son ADN-T et possédant encore les gènes de virulence. Il induira à distance le transfert de l'ADN-T recombiné de l'autre plasmide, on parle d'action en trans. L'autre plasmide est un vecteur de petite taille qui porte l'ADN-T recombiné, donc la construction génétique. Ce vecteur, appelé vecteur binaire, possède la capacité de se répliquer dans Agrobacterium mais aussi dans E. coli.

C'est donc à la fois un vecteur de transfert et un vecteur de clonage. Cette technique est de plus en plus utilisée.

4.3. La transformation biologique



** Coculture et transformation génétique

La transformation génétique est réalisée en mélangeant une culture d'une souche d'*Agrobacterium* transformée, mise en suspension en milieu liquide, avec des explants de la plante, on parle de coculture. C'est au cours de cette étape que la construction génétique introduite dans la bactérie est transférée dans le génome de la plante.

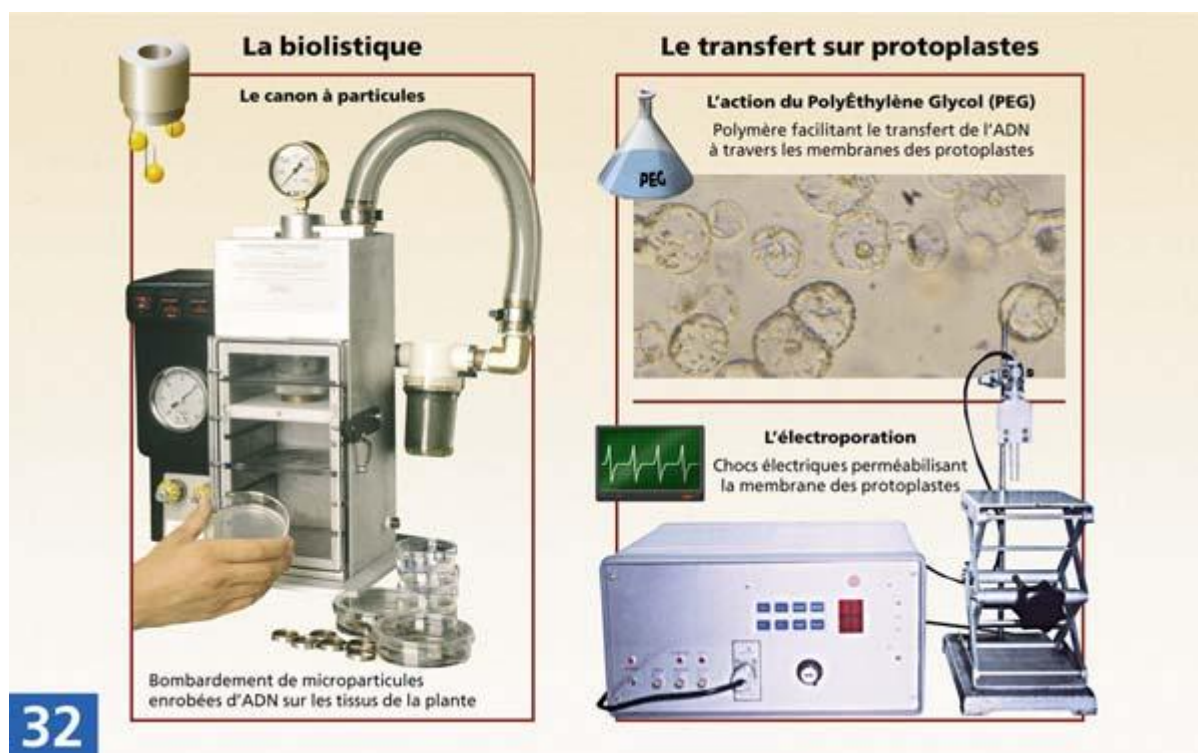
** Sélection des cellules transformées

La coculture est lavée pour éliminer les agrobactéries. Il faut ensuite sélectionner les cellules qui sont effectivement transformées. Pour cela, on apporte dans la culture des explants un agent sélectif approprié: herbicide, antibiotique. Seules les cellules végétales transformées, c'est-à-dire celles possédant et exprimant le gène marqueur de sélection, soit de résistance à un herbicide, soit de résistance à un antibiotique, pourront se développer.

** Applications

Cette technique de transformation par **Agrobacterium** a été appliquée avec succès à différentes espèces végétales dont le colza, la tomate, le coton, la pomme de terre, le soja, la courgette, le tabac, le maïs, le riz... La transformation biologique est également possible chez de nombreuses autres espèces.

4.4. Le transfert direct



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

4.4.1. La biolistique

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

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

4.4.2. Le transfert sur protoplastes

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

Les molécules d'ADN pénètrent dans les protoplastes, elles doivent atteindre ensuite le noyau et s'intégrer dans un chromosome de la cellule végétale. Deux techniques principales permettent d'introduire l'ADN dans les protoplastes :

**** L'action du PolyÉthylène Glycol (PEG)**

Le PEG est un polymère qui déstabilise de façon réversible les membranes plasmiques, permettant ainsi le transfert de l'ADN au travers de la membrane.

Cette méthode a permis l'obtention de maïs résistant à une matière active herbicide, le glufosinate. Elle est également utilisée sur la betterave.

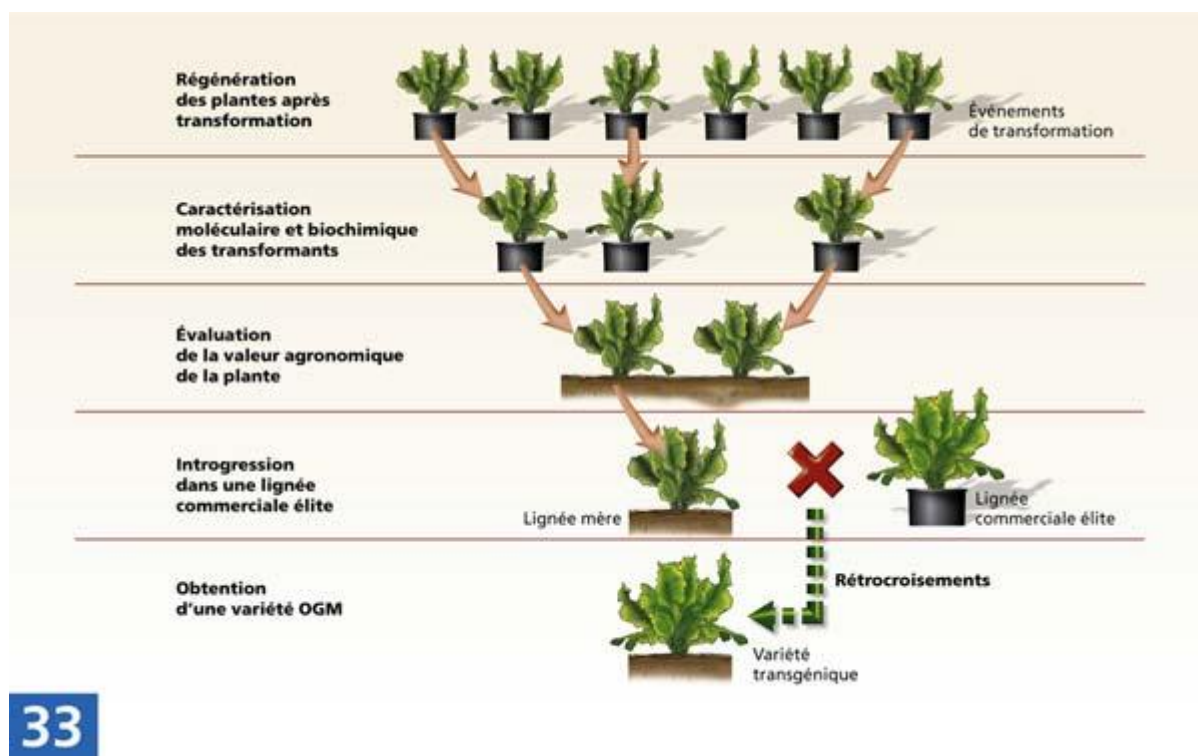
**** L'électroporation**

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

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

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

4.5. L'obtention d'une variété OGM



33

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

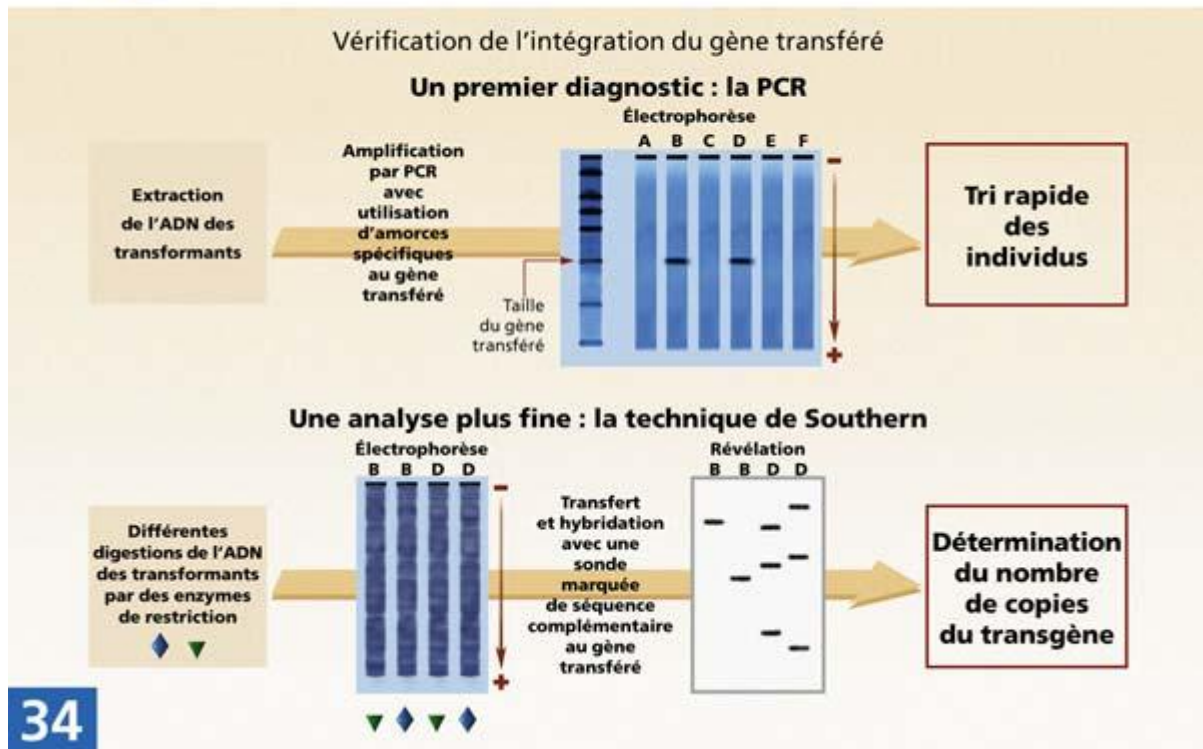
4.5.1. Caractérisation moléculaire et biochimique des transformants

Il faut d'abord s'assurer qu'une plante sélectionnée par sa résistance à un agent de sélection, herbicide ou antibiotique, a bien intégré le gène d'intérêt dans son génome. Ensuite, l'événement de transformation doit être caractérisé. On identifie le ou les sites d'intégration du gène et le nombre de copies intégrées dans le génome. Ces paramètres peuvent influencer le niveau d'expression du gène. Ainsi des analyses moléculaires sont conduites afin d'analyser les événements de transformation. Enfin, il faut s'assurer que le gène introduit s'exprime et produit la protéine désirée, en quantité suffisante. Pour cela, des analyses biochimiques vont être réalisées. A cette étape, de nombreuses plantes transgéniques seront éliminées par défaut d'expression du gène d'intérêt.

4.5.1.1. La caractérisation moléculaire des transformants



La caractérisation moléculaire des transformants



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

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

Un premier diagnostic : la PCR (Polymerase Chain Reaction)

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

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

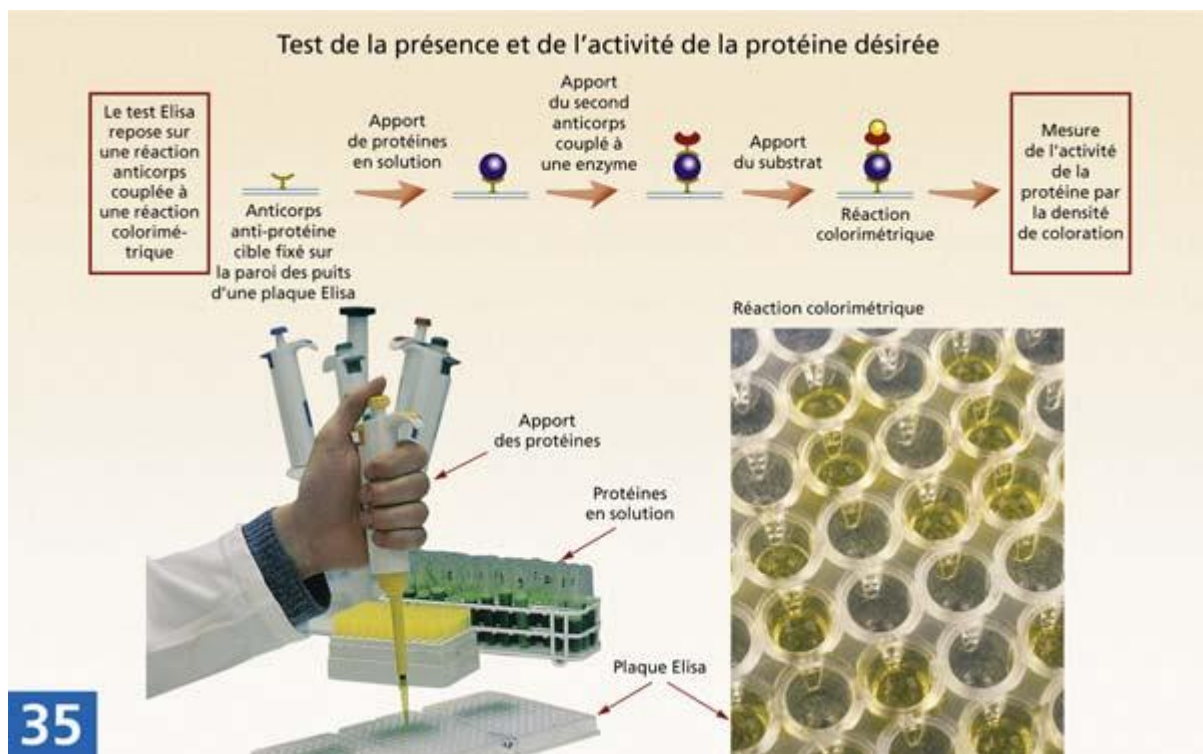
Pour caractériser si ce gène s'exprime, on utilisera la PCR reverse (RT-PCR). Cette technique permet de vérifier la présence d'ARN messager, transcrit spécifiquement à partir du gène

introduit.

Une analyse plus fine : la technique de Southern

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

4.5.1.2. La caractérisation Biochimique des transformants



Après vérification de la présence du nouveau gène dans la plante, il est nécessaire de déterminer si ce gène produit ou non la protéine désirée et en quelle quantité. Pour tester la présence et l'activité de la protéine, un test Elisa (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, Immuno-essais avec couplage enzymatique) est utilisé.

Pour cela, les protéines sont obtenues à partir du broyage de tissus de plantes transformées. Ce test repose sur une liaison spécifique entre un anticorps anti-protéine cible fixé à la paroi des puits d'une plaque Elisa et la protéine produite par le gène. Un deuxième anticorps spécifique de la protéine, couplé à une enzyme, est ajouté dans le milieu. Si la protéine est présente, il se forme un complexe anticorps-protéine-anticorps. Ensuite, on réalise un test colorimétrique : le substrat de l'enzyme est ajouté au milieu, il se lie sur les complexes fixés à la paroi et la solution change de couleur. C'est donc une méthode visuelle de détection de la présence de la protéine.

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

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

4.5.2. Evaluation de la valeur agronomique de la plante

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

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

4.5.3. Introgression dans une lignée commerciale élite

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

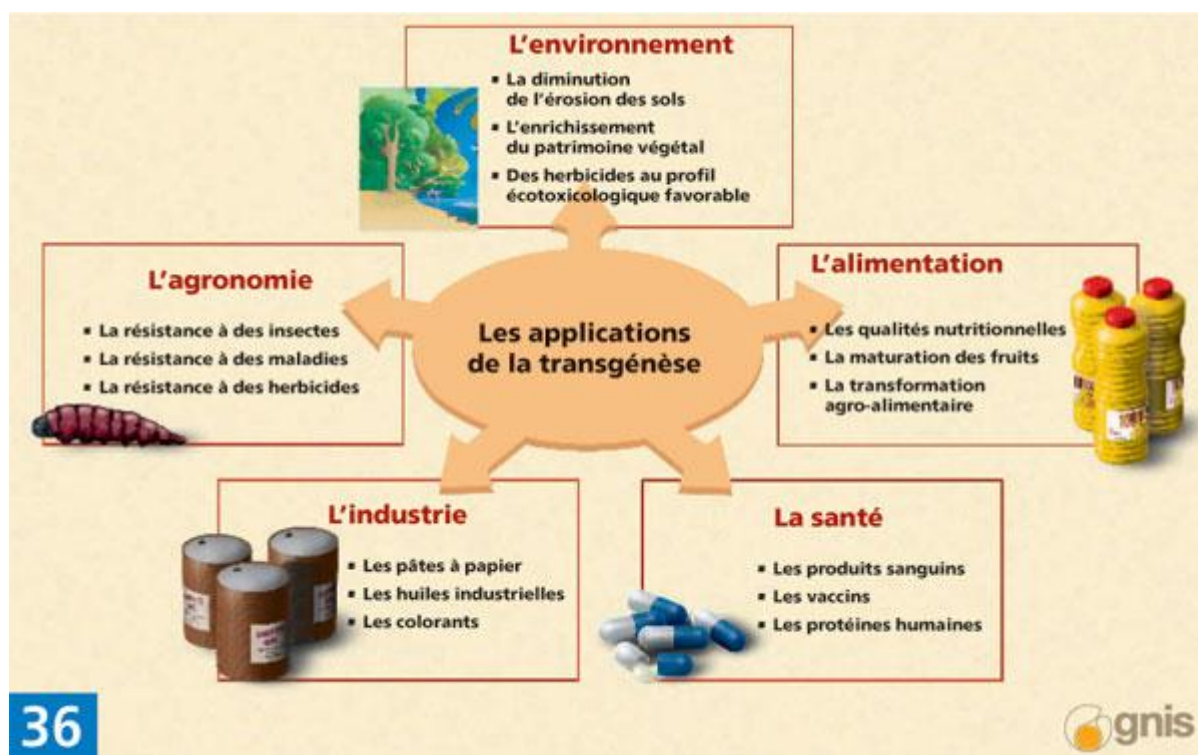
d'hybridation, on ne conserve que le gène d'intérêt et on élimine le reste du patrimoine génétique de la lignée mère.

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

4.5.4. La biosécurité

Au niveau de la production et de la manipulation des OGM, des guides de bonnes pratiques en biosécurité ont été édités par l'AFNOR dans le cadre des recommandations de l'Organisation de la Coopération et de Développement Economique (OCDE). De plus, chaque entreprise applique des règles internes de précaution très strictes.

5. Les domaines d'application de la transgénèse



La publication des travaux de recherche et les demandes d'autorisation d'expérimentation et de mise sur le marché indiquent les espèces concernées par la transgénèse, les applications actuelles et les perspectives à venir.

Celles-ci peuvent être regroupées dans quatre grands domaines : améliorations agronomiques, qualités alimentaires, production de molécules à intérêt industriel et production de molécules

destinées à la santé humaine.

5.1. L'agronomie

De nombreux travaux de transgénèse concernent l'introduction de gènes de résistance aux herbicides ou aux insectes, et dans une moindre mesure, à certains virus et maladies. Associées à un usage raisonné d'herbicides et de pesticides, ces plantes transgéniques vont améliorer l'efficacité de l'agriculture, tout en respectant encore mieux l'environnement.

**** La résistance à des insectes**

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

Dans le cas du maïs, la résistance à la pyrale est conférée par le gène *Cry A*, appelé communément *Bt*. Ce gène permet dans les cellules du maïs, la production d'une protéine qui se transforme en toxine dans le tube digestif de la pyrale. Chez les autres animaux et chez l'homme, cette protéine est simplement digérée sans aucun effet toxique.

****La résistance à des maladies**

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

L'obtention de plantes résistant aux champignons et aux bactéries est en cours de développement.

**** La résistance à des herbicides**

Le glufosinate (Basta ou Liberty) et le glyphosate (Roundup) sont des herbicides totaux qui détruisent aussi bien les mauvaises herbes que les plantes cultivées. Les gènes de résistance à

l'herbicide introduits dans une plante empêchent la matière active d'agir sur celle-ci, transformant l'herbicide total en herbicide sélectif sur cette plante. Ainsi l'herbicide détruit toutes les mauvaises herbes présentes tout en respectant totalement la plante cultivée.

De plus, ces désherbants totaux ont la propriété de ne pas être 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.

5.2. L'alimentation

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

**** Les qualités nutritionnelles**

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

**** La maturation des fruits**

Ce sont les résultats les plus avancés concernant la qualité alimentaire. Sur le melon, sur la tomate, on a pu obtenir des variétés transgéniques à maturation retardée. Ces fruits peuvent être récoltés à un stade de maturation plus avancé, donc être plus savoureux. D'autre part, il en résulte une meilleure conservation et une aptitude au transport améliorée, réduisant les pertes.

Le melon est le premier fruit génétiquement modifié obtenu par un laboratoire de recherche français. Un gène capable de bloquer la synthèse de l'éthylène a été introduit, ce qui ralentit la maturation. Le détachement du fruit est retardé et le melon maintenu sur pied continue d'accumuler des sucres.

**** La transformation agro-alimentaire**

Dans ce domaine, les champs d'application potentiels sont très variés : il peut s'agir de la production des protéines impliquées dans des procédés agro-alimentaires, ou de la modification des

caractéristiques des végétaux pour optimiser leur utilisation.

Ainsi, des travaux ont permis de modifier la teneur en amidon chez la pomme de terre, afin d'augmenter la teneur en matière sèche, et de disposer ainsi de pommes de terre mieux adaptées à la fabrication de féculé, de purée ou de chips.

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

5.3. L'industrie

Les biotechnologies ouvrent de nombreuses perspectives dans les domaines de l'industrie, en produisant des molécules nouvelles (Molecular Farming) et en améliorant les procédés industriels et la qualité des produits.

**** Les pâtes à papier**

Les lignines sont l'un des constituants majeurs du bois, mais elles gênent l'industrie papetière qui ne peut les valoriser et doit les éliminer par des méthodes coûteuses et polluantes.

Des travaux conduits par la recherche publique française ont permis de connaître 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. Ceci facilite le blanchissement de la pâte à papier et donc réduit l'impact sur l'environnement. Le même type de travail a été réalisé sur l'eucalyptus.

**** Les huiles industrielles**

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

**** Les colorants**

Un exemple original est l'obtention de cotons transgéniques de couleur grâce à l'introduction d'un

gène bactérien ou végétal codant pour un pigment. Ceci évitera l'utilisation de teintures chimiques difficilement recyclables.

5.4. La santé

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

**** Les produits sanguins**

Des recherches menées en France ont déjà permis de faire produire des protéines plasmatiques à des plants de tabac transgéniques, permettant l'obtention d'hémoglobine humaine recombinée.

Des travaux montrent qu'il est possible de synthétiser de l'albumine humaine, employée lors du traitement des traumatismes, à partir de tabac ou de pomme de terre. Cette albumine devrait être moins chère que celle issue du plasma sanguin. Cette nouvelle source permettrait de répondre à l'augmentation des besoins.

**** Les vaccins**

Des chercheurs américains travaillent à la mise au point d'une banane vaccin pour l'homme, prévenant les cas de gastro-entérites provoquées par la bactérie *E. coli*. Il serait alors envisageable de vacciner à faible coût les populations de pays en voie de développement, les plus touchées par ces diarrhées d'origine bactérienne.

**** Les protéines humaines**

Des travaux sont actuellement en cours pour faire produire des protéines ou des glycoprotéines à usage thérapeutique à partir de soja, de tabac, de pomme de terre, de riz ou de colza.

5.5. L'environnement

Le recours à des variétés transgéniques permet une moindre utilisation d'insecticides et d'herbicides et ouvre le champ de la recherche sur les pratiques culturales simplifiées.

**** Des herbicides au profil écotoxicologique favorable**

La création de plantes tolérantes aux herbicides permet l'utilisation de matières actives au

profil écotoxicologique favorable, c'est-à-dire à faible durée de vie, à biodégradabilité rapide, respectant et l'environnement et à large efficacité.

Ces cultures peuvent supporter ce traitement grâce à l'introduction d'un gène de tolérance spécifique. En 1996, un nouveau système de désherbage a été lancé en Amérique du Nord sur des cultures comme le soja, le colza et le maïs.

**** La réduction de l'utilisation des insecticides**

Une étude sur l'impact du coton bt (résistant aux insectes) montre qu'en 1999, les agriculteurs chinois ayant adoptés des variétés bt ont consommé en moyenne 10 kg/ha d'insecticides contre 58 kg/ha pour les agriculteurs ayant cultivé des variétés non transgéniques ("impact of bt cotton in china", Carl E. Pray et al, center for chinese Agricultural Policy, Chinese Academy of Sciences, China, may 2001).

**** La diminution de l'érosion des sols**

Une étude sur 5 ans (1996 à 2001) auprès de 450 cultivateurs américains de soja montre que pour 63 % d'entre eux, le développement des techniques culturales sans labour, qui permet une réduction de l'érosion des sols de l'ordre de 90 %, est rendu possible en premier lieu par l'introduction de variétés de soja transgéniques tolérant à un herbicide.

**** L'enrichissement du patrimoine végétal**

La sélection classique a déjà fait la preuve de sa capacité à enrichir les espèces et variétés. Par la création de variétés nouvelles qui constitue l'objectif premier de son activité, la sélection classique a ainsi doté le "patrimoine végétal" de spécimens nouveaux. Dès les origines de l'agriculture, cette activité de sélection empirique a été à l'origine de nombreuses variétés aujourd'hui partie intégrante de ce patrimoine.

Les biotechnologies modernes, et le génie génétique, s'inscrivent dans cette continuité avec une diversité d'objectifs. Elles ont à leur disposition des outils qui ouvrent davantage encore le champ des possibles. Dès lors, les biotechnologies vont contribuer encore à l'extension du patrimoine végétal.

**** Le maïs transgénique utilisant mieux l'eau disponible**

L'amélioration des rendements du maïs est due à un grand nombre de facteurs, dont l'un des

plus importants est la tolérance aux stress environnementaux. Cette amélioration est surtout attribuée à une augmentation de la performance des lignées parentales, qui sont en partie tolérantes à un déficit d'eau. En effet, pour le maïs, la période pendant la pollinisation et le début du remplissage des grains est la plus sensible à un stress hydrique.

Pourtant, l'eau est une ressource limitée dont l'agriculture est la première utilisatrice, devant l'industrie et la consommation humaine. Pour la culture du maïs, une façon de diminuer l'utilisation d'eau consiste à créer des variétés qui tolèrent une disponibilité réduite en eau, sans que leurs capacités de production n'en soient affectées.

Grâce à des études génétiques, plusieurs variétés de maïs transgéniques ont été créées par l'introduction de gènes impliqués dans la réponse à un déficit hydrique. Par exemple, un maïs plus tolérant à la sécheresse a été mis au point grâce à l'introduction par transgénèse d'un gène de sorgho, céréale africaine particulièrement tolérante à la sécheresse.

Ce gène code pour une protéine impliquée dans la photosynthèse, la PEPc (*Phosphoénolpyruvate carboxylase*). Les plantes transgéniques obtenues surexpriment cette protéine. Des analyses du comportement photosynthétique de ces plantes en situation de contrainte hydrique en serre ont permis de montrer que l'efficacité d'utilisation de l'eau est significativement augmentée (+ 25 %).

**** La résistance des plantes aux insectes ravageurs**

La lutte contre les ravageurs, notamment les insectes, est réalisée essentiellement par l'utilisation d'insecticides chimiques. Suivant les cultures, les zones géographiques et les années, la fréquence et la sévérité des attaques d'insectes sont très variables. Selon les cas, l'application d'insecticide est systématique ou décidée sur la base de comptages des insectes (ou de larves) "nuisibles" lors de contrôles dans les champs.

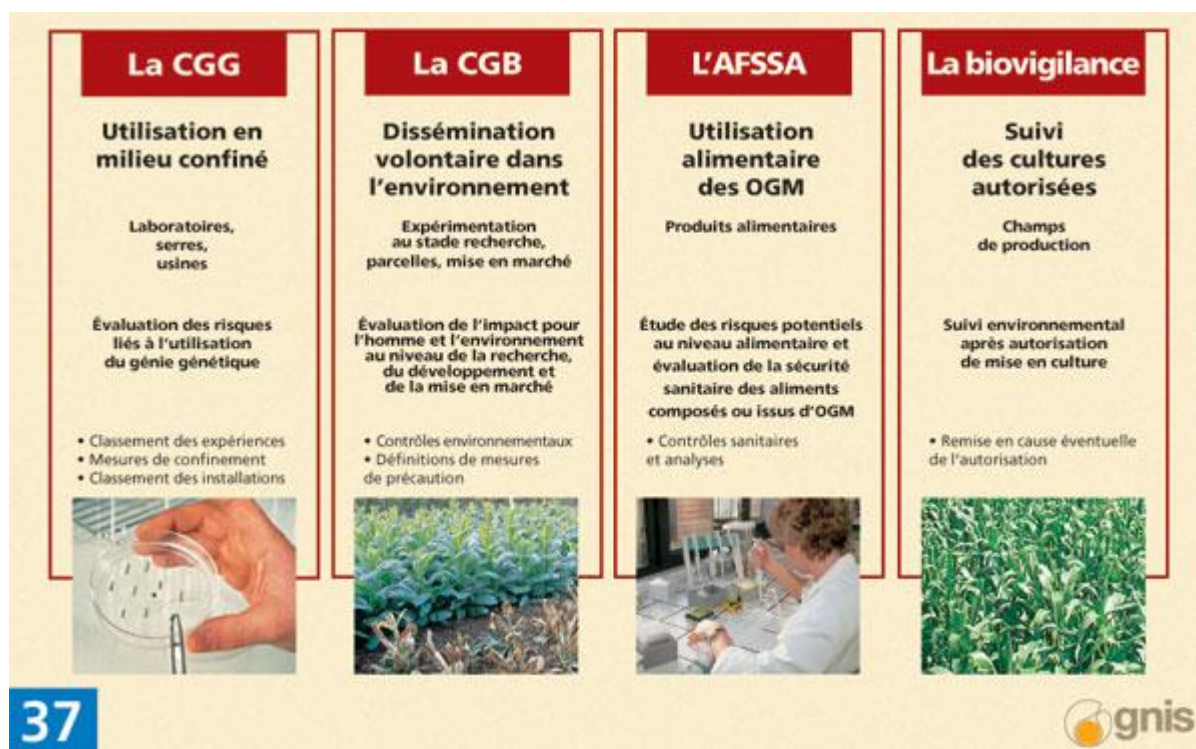
La transgénèse offre aujourd'hui un outil supplémentaire aux agriculteurs pour limiter les traitements chimiques et protéger leurs récoltes contre les insectes et les maladies et ainsi réduire les pertes.

Pour rendre une plante résistante à un insecte, un gène codant une protéine toxique pour cet insecte a été introduit dans le génome de la plante. Jusqu'à présent, pour toutes les variétés mises sur le marché, les gènes introduits proviennent de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (d'où l'abréviation Bt donnée aux plantes de ce type), bien connue depuis longtemps pour ses propriétés insecticides et largement utilisée en agriculture biologique, ainsi que par les exploitants forestiers et les jardiniers.

En 2002, La résistance aux insectes représente 17 % (10,1 millions d'hectares) de la surface totale d'OGM cultivés dans le monde.

6. La réglementation sur les OGM

6.1. Les dispositifs d'évaluation et de contrôle de risques



Les pouvoirs publics ont pris des mesures pour évaluer et contrôler les risques éventuels, pour l'environnement et pour l'homme, dus à l'utilisation ou à la dissémination des organismes génétiquement modifiés (OGM). Sont considérés comme OGM, des organismes modifiés par les techniques d'ADN recombinant (transgénèse). Ainsi, les organismes obtenus par fusion de protoplastes, culture in vitro et mutagénèse ne font pas partie du champ des lois relatives aux OGM.

** La Commission du Génie Génétique : la CGG

En France, l'utilisation en milieu confiné (laboratoire, serre, bio-industrie) des OGM ne peut se faire sans l'autorisation de la Commission du génie Génétique (CGG). La CGG est une commission consultative sous tutelle du Ministère de la Recherche, qui examine les dossiers déposés par les laboratoires et les industriels, propose les conditions d'expérimentations sur les OGM en milieu confiné après une évaluation de la classe de risque et du niveau de confinement souhaitable (étude

des techniques, procédés, organismes, sécurité). Le Ministère de la Recherche prend la décision finale et doit ensuite mettre à la disposition des autres membres de l'Union européenne les dossiers constitués.

**** La Commission du Génie Biomoléculaire : la CGB**

En France, la Commission du Génie Biomoléculaire (CGB) examine, au cas par cas, les demandes de dissémination volontaire d'OGM dans l'environnement à des fins de recherche et de développement (dites partie B) ou de mise sur le marché (dites partie C) pour en évaluer les risques pour la santé publique et pour l'environnement. La CGB est une commission consultative sous tutelle du Ministère de l'Agriculture et de l'Environnement qui a été créée en 1986. La CGB propose également des mesures de précaution. Elle émet un avis que la Direction Générale de l'Alimentation traduit en autorisation.

**** L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA)**

En France, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) est saisie par la CGB. Elle étudie plus particulièrement les risques potentiels au niveau alimentaire et évalue la sécurité sanitaire des aliments composés ou issus d'organismes génétiquement modifiés. Ce sont donc les avis de ces deux institutions qui permettent d'éclairer les pouvoirs publics sur les décisions à arrêter. Lorsque les avis de la CGB et de l'AFSSA sont favorables, les pouvoirs publics transmettent le dossier à la Commission européenne.

**** Le Comité de Biovigilance**

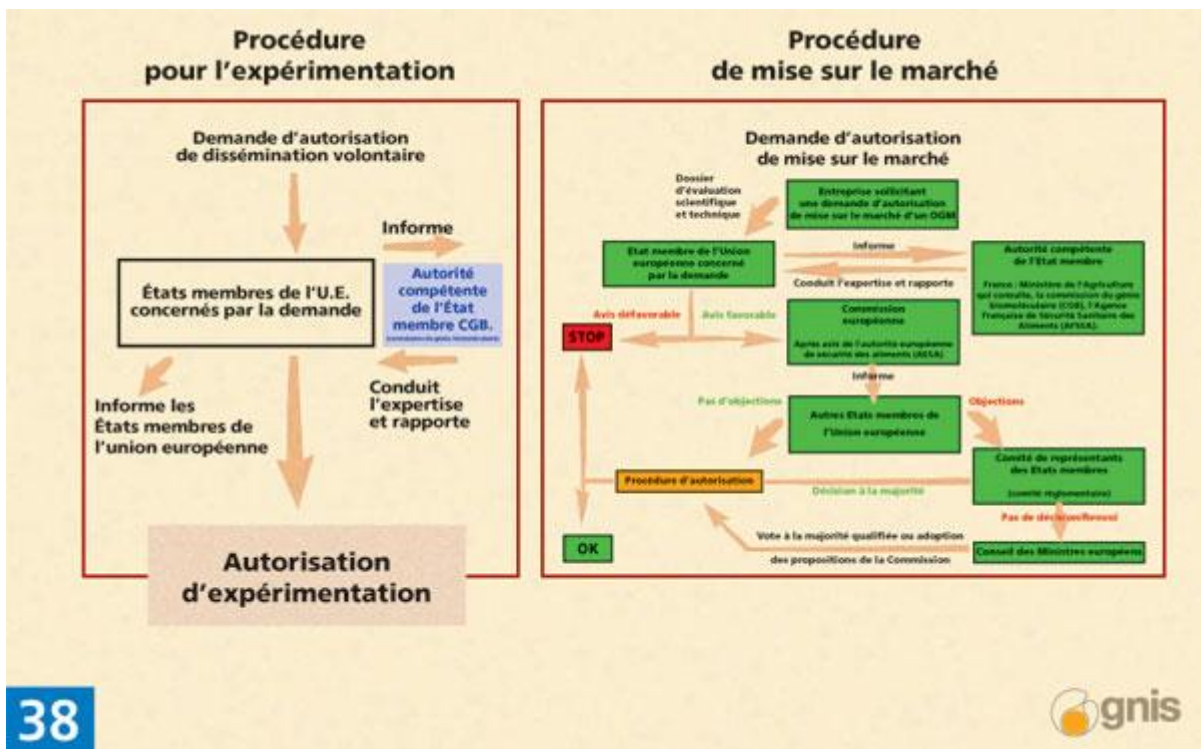
En 1998, le gouvernement français s'est donné les moyens de suivre dans la durée les conséquences éventuelles pour l'environnement des produits ayant reçu une autorisation. Ainsi, un comité de surveillance biologique composé d'experts et de représentants de la société civile a été créé et un suivi environnemental des cultures est assuré par les Services de la Protection des Végétaux, sous la responsabilité du ministère de l'Agriculture par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) et du ministère de l'Environnement. Cette biovigilance garantit une sécurité supplémentaire qui peut, si nécessaire, conduire à remettre en cause les autorisations accordées. La directive 2001/18 renforce les contraintes liées à la dissémination des OGM dans l'environnement, notamment en matière de suivi à moyens et longs termes des OGM dans l'environnement.

Le dispositif de biovigilance distingue deux types d'actions de Biovigilance :

- **Les actions de monitoring** ou de surveillance spécifique, définies en groupe de travail, sur la base d'une interrogation du Comité de Biovigilance. L'action de monitoring est limitée dans le temps (1 à 5 ans) et dans l'espace. elle consiste en la mise en place d'un dispositif dont les principaux paramètres sont maîtrisés (comparaison entre une plante génétiquement modifiée et la même plante non génétiquement modifiée, par exemple).

- **Les actions de surveillance générale**, permettant de définir l'impact de plantes transgéniques sur les milieux, plus spécifiquement faune et flore, dans la parcelle et dans les parcelles voisines. La surveillance générale peut s'exercer sur tout type de parcelle, OGM ou non. Elle a pour objet de détecter des perturbations dans la représentation des espèces dans une perspective de long terme et s'exerce sur une échelle d'espace importante. Chaque année, un bilan de l'utilisation de plantes transgéniques est présenté par les Services de Protection des végétaux aux membres du Comité de Biovigilance. Si des effets indésirables sont mis en évidence, le Comité pourra demander aux ministres de l'Agriculture et de l'Environnement une réévaluation du risque, pouvant conduire à un retrait par les pouvoirs publics des autorisations des variétés transgéniques en cause.

6.2. Les démarches à suivre



**** Procédure pour l'expérimentation**

En France, la **Commission du Génie Biomoléculaire (CGB)** examine, au cas par cas, les demandes de dissémination volontaire d'OGM dans l'environnement à des fins de recherche et de développement (dites partie B) ou de mise sur le marché (dites partie C) pour en évaluer les risques pour la santé publique et pour l'environnement (Directive 2001/18/CE). La CGB est une commission consultative sous tutelle du Ministère de l'Agriculture et de l'Environnement. Les demandes d'autorisation de dissémination à des fins de recherche et de développement sont traitées au niveau national. Il incombe toutefois à l'Etat de tenir informés les autres Etats membres et la Commission des activités de recherche conduites sur le territoire national. Le public est informé du lieu d'expérimentation par un affichage dans la mairie de la commune concernée.

**** Procédure de mise sur le marché**

Une variété OGM ne peut être commercialisée qu'après avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché, correspondant à la partie C de la directive européenne et une inscription au catalogue français, pour les espèces régies par le catalogue.

Les autorisations de mise sur le marché de plantes ou de produits génétiquement modifiés sont demandées pour la culture et l'utilisation ou seulement pour l'importation et l'utilisation. Elles sont données par la Commission Européenne.

La demande d'autorisation doit être faite dans le pays où le produit doit être commercialisé pour la première fois. L'autorité compétente de ce pays analyse le dossier en s'appuyant sur les structures d'expertises nationales et transmet, via le gouvernement, un rapport d'évaluation à la Commission Européenne qui informe les autres pays membres de l'Union. Si le rapport est porteur d'un avis favorable, et si aucune objection des autres Etats membres n'est émise, l'Autorité à l'origine de l'évaluation initiale accorde l'autorisation de mise sur le marché de l'OGM concerné. Celui-ci peut alors être commercialisé dans l'ensemble de l'Union européenne dans le respect des conditions requises par l'autorisation. Par contre, si un pays membre émet des objections, la décision d'autorisation doit être prise au niveau communautaire.

6.3. La sécurité alimentaire et l'étiquetage



** La réglementation en matière d'étiquetage

Le règlement fondateur européen de 1997 dit "nouveaux aliments" (Novel foods) rend obligatoire l'étiquetage des aliments génétiquement modifiés, ainsi que les produits dérivés d'OGM ayant été produits à partir de ceux-ci, dès lors que le produit n'est pas équivalent en substance.

L'obligation d'étiquetage a été étendue par un règlement en 1998, avec une obligation d'étiqueter les aliments et ingrédients fabriqués à partir du maïs Bt et de fèves de soja, dont la commercialisation avait été autorisée avant l'entrée en vigueur du règlement "Novel Foods". Deux mentions obligatoires sont prévues :

- "produit à partir de soja/maïs génétiquement modifié",
- "contient des [ingrédients] fabriqués à partir de soja/maïs génétiquement modifié".

La directive 2001/18/CE prévoit que les Etats membres prennent toutes les mesures nécessaires pour garantir, à tous les stades de la mise sur le marché, l'étiquetage des OGM mis sur le marché en

tant que produits ou éléments de produits.

Le règlement 49/2000/CE concerne la présence accidentelle de matériel génétiquement modifié dans les denrées alimentaires classiques. Il a été fixé un seuil minimal de 1 % de présence accidentelle d'ADN ou de protéines résultant d'une modification génétique dans les denrées alimentaires, au-dessus duquel l'aliment doit être obligatoirement étiqueté.

Le règlement 50/2000/CE, adopté par la Commission européenne en janvier 2000, garantit que les additifs et les arômes soient aussi étiquetés obligatoirement lorsque de l'ADN ou des protéines résultant d'une modification génétique sont présents dans le produit final.

La réglementation actuelle ne couvre pas certains aliments ou ingrédients, dès lors que des traces d'ADN ou de protéines issues de la modification génétique ne sont pas décelables dans le produit final (par exemple, de l'huile de soja ou de maïs hautement raffiné obtenue à partir de soja ou de maïs génétiquement modifié).

**** Une nouvelle réglementation sur l'étiquetage**

Le nouveau règlement est entré en vigueur en avril 2004. Il introduit des exigences strictes en matière d'étiquetage des aliments génétiquement modifiés pour animaux suivant les mêmes principes que les aliments destinés à l'alimentation humaine.

De plus, ce règlement fonde l'obligation d'étiqueter non plus sur la possibilité de détection de protéines ou d'ADN résultant de modifications génétiques, mais sur la possibilité de remonter par la traçabilité à l'utilisation ou non de produits génétiquement modifiés.

Ainsi, le nouveau règlement relatif aux aliments génétiquement modifiés destinés à l'alimentation humaine et animale introduit l'étiquetage de :

- Toutes les denrées alimentaires produites à partir d'OGM, indépendamment de savoir si le produit final contient de l'ADN ou des protéines dérivées d'OGM,
- Tous les aliments génétiquement modifiés pour animaux.

Afin d'éviter un sur-étiquetage, les ministres européens ont décidé que ces obligations devraient s'appliquer uniquement si le produit final contient un OGM à raison de plus de 0,9 % dès lors que la présence de cet OGM est accidentelle ou techniquement inévitable.

Le règlement détermine un seuil de 0,5 % en dessous duquel une présence techniquement inévitable d'OGM, pas encore autorisé dans l'Union européenne, est permise de façon transitoire.

**** La réglementation en matière de traçabilité**

La traçabilité peut être définie comme la capacité de retracer le cheminement des OGM et des produits dérivés, à tous les stades de leur mise sur le marché, tout au long des chaînes de production et de distribution, rendant ainsi le contrôle plus aisé et maintenant également la possibilité de retirer des produits du marché en cas de nécessité.

L'obligation de traçabilité est destinée à faciliter l'étiquetage précis du produit final et à donner les moyens de vérifier et de contrôler les indications figurant sur les étiquettes.

La traçabilité sur les OGM a été introduite en termes généraux dans la législation communautaire par la directive 2001/18/CE qui impose aux Etats membres de garantir la traçabilité à tous les stades de la commercialisation des OGM.

Cependant, la directive 2001/18/CE ne fournit ni la définition de cette notion, ni les objectifs qui s'y rattachent, ni les modalités complètes de sa mise en œuvre.

**** Une nouvelle réglementation sur la traçabilité des OGM**

Une nouvelle règle sur la traçabilité des OGM a été adoptée par les ministres européens de l'Agriculture le 22 juillet 2003. Elle s'applique à tous les OGM, qu'ils soient destinés à l'alimentation humaine ou animale.

Elle prévoit l'obligation de conserver et de transmettre, par les exploitants, les informations sur les produits qui contiennent des OGM ou qui sont fabriqués à partir d'OGM, à chaque étape de la mise sur le marché. L'industrie doit être dotée de systèmes permettant de déterminer par qui, et au profit de qui, les produits génétiquement modifiés sont mis à disposition. Les informations relatives à la présence d'OGM doivent être transmises tout au long de la chaîne commerciale et conservées pendant 5 ans.

Ainsi, la transmission et la conservation de ces informations limiteront les besoins d'échantillonnage et d'essai des produits. De plus, elle limite la perte d'informations spécifiques attachées aux produits lors des traitements successifs qu'ils subissent.