

Université Frères Mentouri Constantine 1  
Faculté SNV  
Département de Microbiologie

# Introduction à la Biotechnologie Microbienne

*Support pédagogique destiné aux étudiants de Master 2, spécialité Ecologie Microbienne*

*PR . R. ALATOU*

# Introduction

**Bio = Vie, Techno = Outils, Logis = Maîtrise**

**La maîtrise des outils du vivant.**

## Définition

Les biotechnologies sont l'ensemble des méthodes et des techniques qui utilisent comme outils des organismes vivants (cellules animales et végétales, **micro organismes...**) ou des parties de ceux-ci (gènes, enzymes, ...). Elles sont situées au carrefour de trois domaines de compétences

- ✓ **Santé,**
- ✓ **Agro-alimentaire,**
- ✓ **Environnement.**

Elles permettent la mise au point et le développement de nouveaux produits pour la **santé** de l'Homme, pour la **qualité** et la **sécurité** de son alimentation, et pour la **protection de son environnement**.

## Généralités

Les biotechnologies, ou « **technologies de bioconversion** » comme leur nom l'indique, résultent d'un mariage entre la science des êtres vivants - la biologie - et un ensemble de techniques nouvelles issues d'autres disciplines telles que la microbiologie, la biochimie, la biophysique, la génétique, la biologie moléculaire, l'informatique...

## Les classes

Biotechnologies <b>vertes</b>	=	Intérêt <b>agricole</b>
Biotechnologies <b>rouges</b>	=	Intérêt <b>médical</b>
Biotechnologies <b>blanches</b>	=	Intérêt <b>industriel</b>

# Intérêts

Les technologies basées sur la transgénèse sont devenues la base des biotechnologies qui s'appuient maintenant sur les nouveaux outils de décryptage des génomes, avec pour but premier **la création de nouveaux produits d'intérêt commerciaux** :

- ❖ la modification génétique d'organismes d'intérêt économique, comme **les céréales, afin de leur donner des caractéristiques qu'elles n'ont pas encore, par exemple la résistance à un nuisible,**
- ❖ La modification génétique d'autres organismes, afin de les rendre utiles à l'homme. **Par exemple la création de chèvres intégrant dans leur génome des gènes d'araignées afin de pouvoir extraire de leur lait des fils utilisables**

## Dans le domaine de l'industrie (**biotechnologies blanche**)

les biotechnologies blanches jouent un rôle croissant dans la bio-industrie, dans les domaines de l'environnement. Les technologies blanches parfois dites de seconde ou troisième génération utilisent généralement des bactéries utilisées comme vectrices et/ou productrices de substances d'intérêt technique et commerciales

Les biotechnologies constituent donc un vaste domaine, aux applications industrielles importantes, et en terme économique un très vaste marché:

➤ **Les biocatalyseurs** : Certains étaient utilisés depuis des siècles, pour la fabrication de produits alimentaires. Ils interviennent maintenant dans les procédés innovants de l'industrie « **propre** » (détergents, pâtisserie et panification, jus de fruit, pour la dégradation de l'amidon en sucres, des additifs pour l'amélioration des qualités nutritives des aliments, industrie laitière pour la conversion du lactose en sucre assimilable etc.....

➤ **Des procédés enzymatiques** permettent des applications industrielles plus « propres » ; dont la production de détergents divers

**Des organismes génétiquement modifiés** (bactéries, champignons) et/ou produits par génie génétique) pourraient améliorer certaines techniques de bioremédiation, notamment pour le traitement et l'utilisation des déchets : traitement des eaux usées, dépollution ou détoxification des sols (métabolisation des polluants par des microorganismes), herbicides, traitement et reconversion des sous produits de l'industrie agro-alimentaire (déchets de cellulose, du petit-lait de la fabrication de fromages et beurres, graisses animales etc.....).

➤ **Les procédés de fermentation traditionnelle** : fermentation alcoolique, acides organiques (acide citrique, acide acétique...), production d'antibiotiques, production de dérivés chimiques

➤ **L'industrie des combustibles et produits organiques alternatifs au pétrole**

**La biologie moléculaire et le génie génétique de l'ADN recombinant** (ADN donneur, ADN vecteur ou ADN hôte) sont utilisés pour la synthèse de produits organiques (produits chimiques ; **protéines : hormones de synthèse, anticorps, facteurs sanguins**)

**Exemple:** Les procédés biologiques de fixation de l'azote : réduction de l'usage des engrais azotés pour les productions agricoles, production d'ammoniac à partir d'azote gazeux atmosphérique.

# **CLASSEMENT DES MICROORGANISMES PROPOSE PAR L'EFOB** **( European Federation of Biotechnologies )**

## **Classement des micro-organismes en fonction de leur pathogénicité**

Par la directive **2000/54/CE**, sont classés en **5 catégories** les **micros organismes connus**:

**Classe 1** : Micro-organismes **sans danger pour l'Homme et l'environnement**. Ils n'ont jamais été décrits comme agent causal de maladies chez l'Homme et ne constituent pas une menace pour l'environnement.

**Classe 2** : Micro-organismes qui peuvent **provoquer des maladies chez l'Homme**, et qui peuvent donc constituer un danger pour le personnel de laboratoire. La dissémination dans l'environnement est peu probable.

**Classe 3** : Micro-organismes qui représentent **une menace importante pour la santé du personnel de laboratoire**

**Classe 4** : Micro-organismes qui **causent des maladies graves chez l'Homme et représentent un danger important pour le personnel de laboratoire et les personnes en général**.

**Groupe E** (risque pour l'environnement) : ce groupe contient les micro-organismes qui représentent une **menace plus importante pour l'environnement que pour l'Homme**. Ils peuvent être responsables de lourdes pertes économiques.

Dans les domaines du **nettoyage, de l'assainissement** (amélioration de la situation sanitaire de l'environnement) et **de la dépollution**, seule **la classe 1 est autorisée**.

Quelques industries utilisent des souches de bactéries de **classe 1 non pathogènes et non modifiées génétiquement** (selon la norme AFNOR X42-040).

# Application

## 1. Principe du BIOSURF

Ce procédé consiste à exprimer chez des bactéries des substances biochimiques naturelles comme les tensioactifs ou biosurfactants: qui modifient la tension superficielle entre deux surfaces. Ces substances sont stabilisées, puis intégrées à la formulation des produits liquides pour en renforcer le profil écologique.

### **Action :**

- Dégrade la matière organique.
- Nettoie et désincruste en profondeur.
- Elimine les odeurs.
- Aide à la biodégradation.

## **2. Principe du CHEB**

Ces produits sont issus d'un **C**omplexe d'**H**uiles **E**ssentielles **B**actériostatiques pures et naturelles de plantes. Les huiles essentielles ont des propriétés assainissantes et limitent la prolifération des bactéries par leur action bactériostatique. Ces produits possèdent des taux exceptionnels de biodégradabilité.

### **Action :**

L'association de certaines huiles essentielles pures et naturelles, permet d'obtenir diverses propriétés :

- nettoyantes,
- répulsives,
- désodorisantes,
- dégraissantes,
- sans risque pour l'utilisateur et son environnement...

**Les procédés CHEB sont biodégradables à 100% et ont un parfum léger et naturel de plantes.**

## **Les produits issus des Biotechnologies sont :**

- Très faciles à utiliser, sous forme liquide ou poudre
- En harmonie avec l'Homme et son environnement.
- Ne nécessitant pas de connaissance particulière
- **Micro-organismes de la Classe 1 (E.F.B.).pour leur applications.**
- Des produits aux huiles essentielles, biodégradables à 100%.

Université Frères Mentouri Constantine 1  
Faculté SNV  
Département de Microbiologie

# Purification des **protéines recombinantes**

*Support pédagogique destiné aux étudiants de Master 2 , spécialité Ecologie Microbienne*

Présentée par *PR ALATOU R.*

**Protéine recombinante**



**Protéine hétérologue**



**Production d'une protéine dans un autre organisme  
différent du sien**

Les techniques de **clonage moléculaire** font que pratiquement, n'importe quel **gène** codant pour une **protéine** peut être **isolé** de son organisme d'origine (gène humain, par exemple), **inséré dans un ADN circulaire** désigné « **vecteur** », et exprimé en grande quantité dans une bactérie ou une levure. La protéine **surexprimée** peut représenter jusqu'à 40% des protéines totales de la cellule surproductrice, ce qui facilite facilement sa purification

# **Purification des protéines**

# I. SOLUBILISATION DES PROTEINES

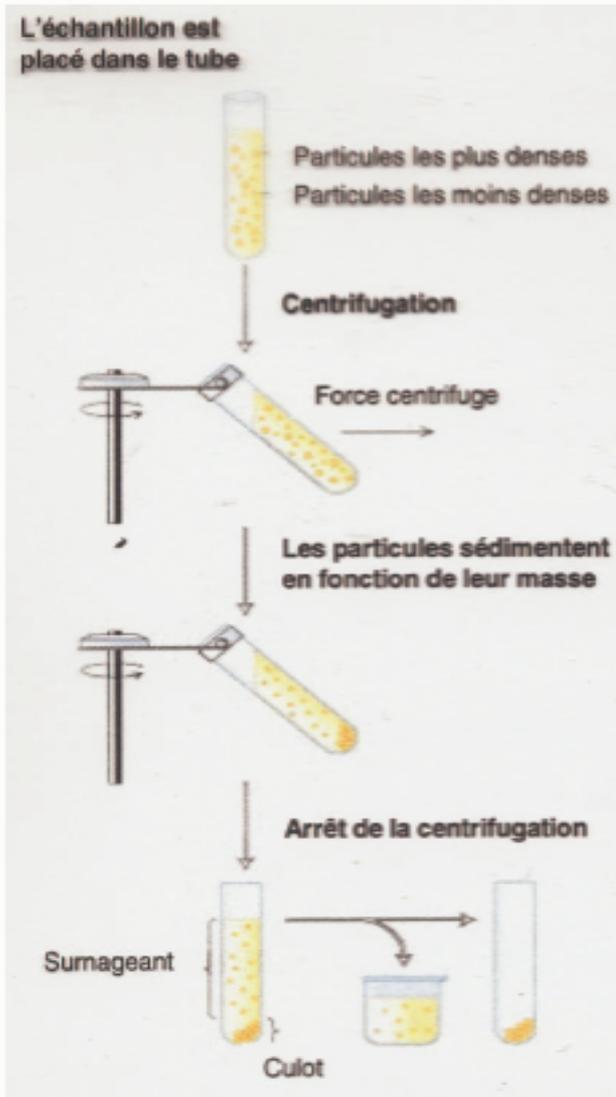
**But:** Obtention de protéines en solution

**Cas particulier des protéines sériques:** sont naturellement en solution

**Cas général:** les protéines doivent être libérées des cellules dans lesquelles elles se trouvent

- **Lyse hypotonique**: entrée d'eau dans la cellule, gonflement, éclatement (bonne technique pour les cellules animales)
- **Lysozyme**: dégrade les parois des bactéries gram +
- **Détergents, solvants organiques** (acétone, toluène) mais ce sont des agents dénaturants
- **Broyage des tissus**
- **Ultra-sons**
- **Eclatement sous haute pression** (Presse de French)

A l'issue du traitement choisi, l'expérimentateur obtient un **lysate cellulaire** souvent désigné « **extrait initial** » ou « **extrait brut** »



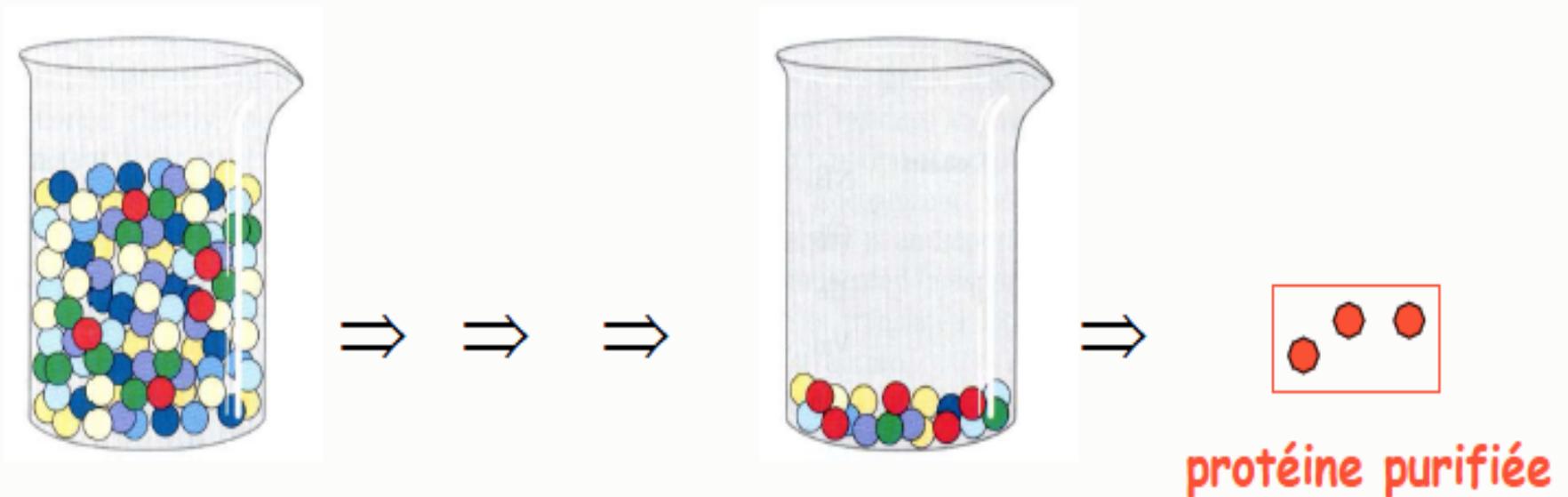
Cet extrait est centrifugé à basse vitesse afin d'éliminer les débris cellulaires grossiers; ceux-ci sont entraînés en une masse compacte solide au fond du tube et constituent le « **culot** » de centrifugation.

Les protéines solubles sont dans la phase liquide et constituent le « **surnageant** »

Cellule bactérienne: ~3 000 protéines

Cellule d'eucaryote: ~30 000 à 50 000 protéines

En prenant l'exemple plus simple de la cellule bactérienne, **purifier l'une** des 3 000 protéines consiste à isoler cette protéine des 2 999 autres; ces dernières, non désirées, sont désignées « protéines contaminantes » et doivent être éliminées.



## II. Méthodes de purification des protéines

Les protéines peuvent être séparées les unes des autres sur la base

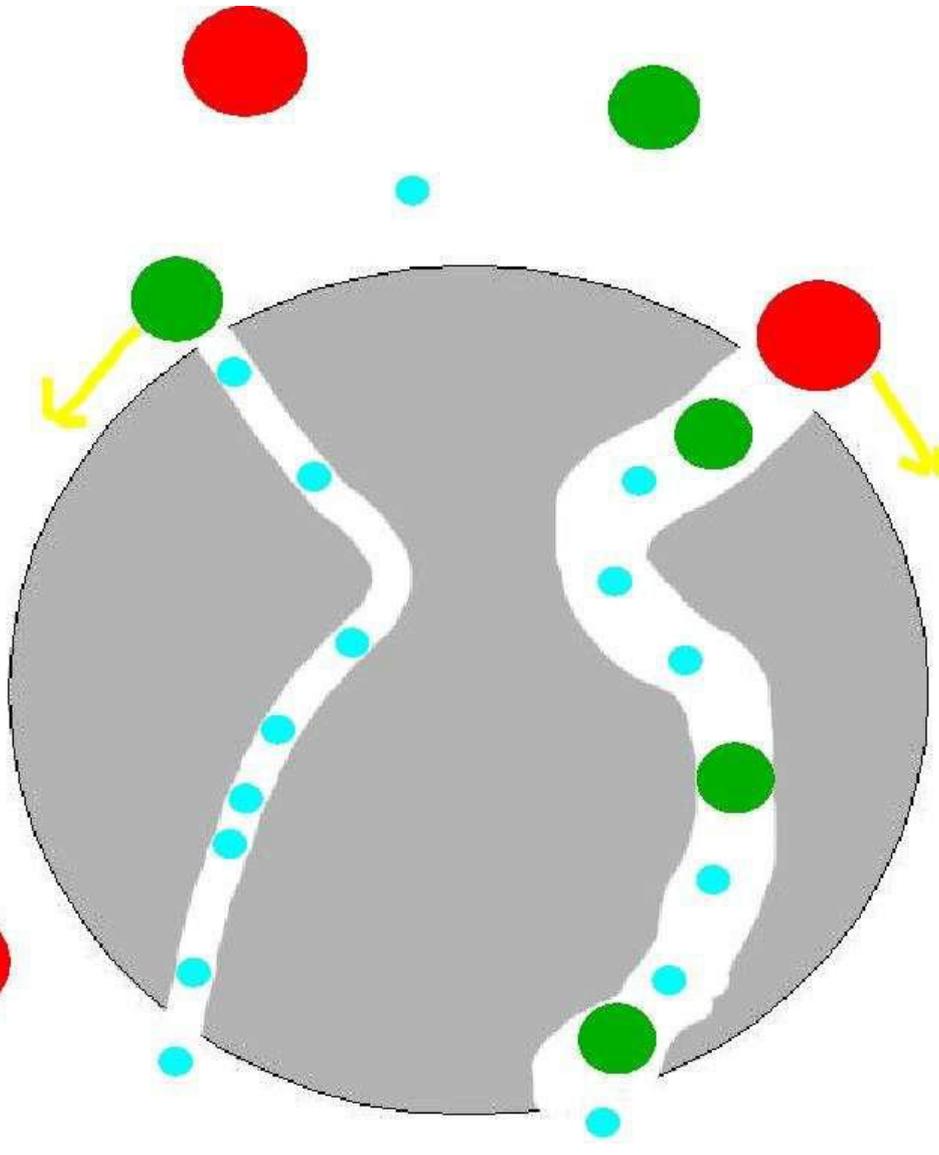
- de leur **solubilité** (celle-ci est minimum au point isoélectrique de la protéine)  $\Leftrightarrow$  **précipitation**
- de leur **taille**  $\Leftrightarrow$  **masse**
- de leur **densité**
- de leur **charge nette** à un pH donné
- de leur plus ou moins grande **affinité pour la phase aqueuse** (protéines **hydrophiles**, protéines **hydrophobes**)
- de leur **capacité à se lier de façon spécifique** à une autre molécule (affinité)

## II.I Chromatographie par gel filtration (Tamisage moléculaire)

Le support est constitué de **microbilles** qui présentent de nombreux pores de tailles variables.

La différence en taille des pores entraîne un tamisage des molécules selon **leur taille et donc aussi leur masse**, c'est-à-dire que plus les molécules seront petites et plus grand sera le nombre de pores qu'elles pourront pénétrer, retardant d'autant leur diffusion dans la colonne. Inversement, plus les molécules seront grosses et moins elles pourront pénétrer de pores.

# Chromatographie par gel filtration



**Les petites molécules mettront plus longtemps à sortir (limite inférieure)**  
**Les plus grosses ne pourront pénétrer aucun pore (limite supérieure)**  
**Les molécules de taille intermédiaire pourront être séparées en fonction de leur taille : le temps passé dans la colonne sera fonction du nombre de pores qu'elles pénétreront.**

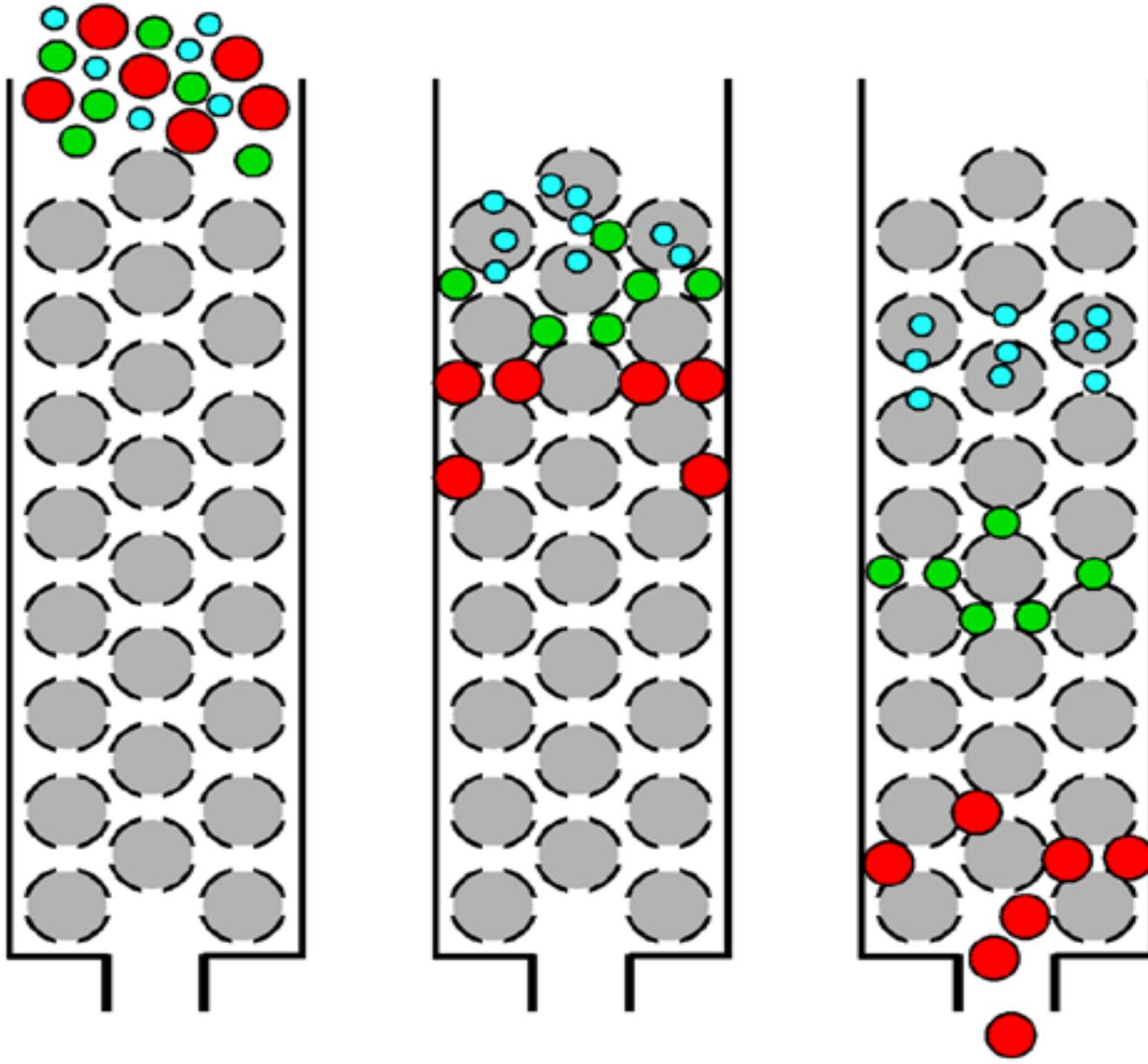
# Chromatographie par gel filtration

Deux cas limites se présentent :

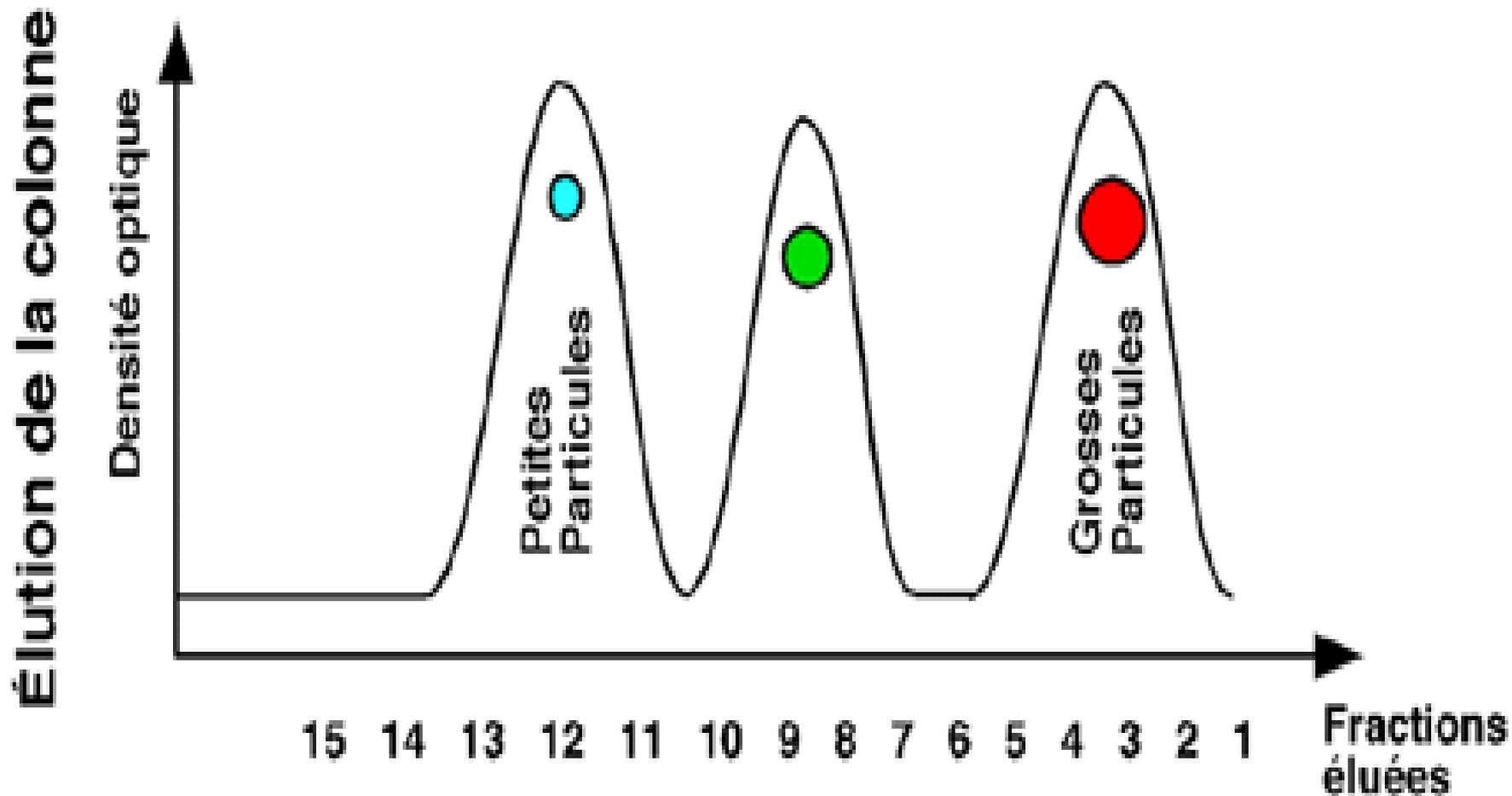
- le cas des molécules qui sont **trop grosses et ne peuvent pénétrer aucun pore** donc la limite supérieure de fractionnement est appelée **la limite d'exclusion**
- **le cas des molécules si petites qu'elles entrent dans tous les pores.**

Les deux cas limites définissent respectivement les limites supérieure et inférieure de masse moléculaire en dehors des quelles la séparation des molécules selon leur taille n'est pas possible. À chaque colonne de gel-filtration sera donc associé un ***domaine de fractionnement exprimé en masse moléculaire.***

# Chromatographie par gel filtration



# Chromatographie par gel filtration



# Chromatographie par gel filtration

Le volume d'élution,  $V_e$ , correspond au volume où une substance est recueillie en sortie de colonne= **Molécules intermédiaires**

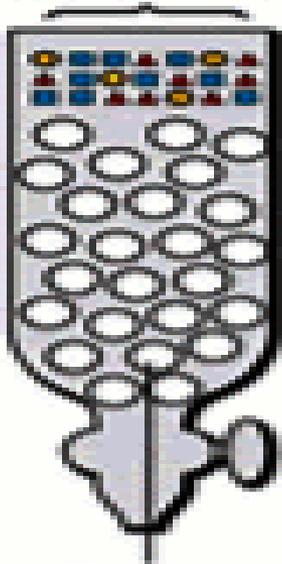
$V_0$  : volume mort et correspond au volume d'élution des **très grosses molécules qui ne pénètrent aucun pore.**

$V_0 + V_i$  : **Molécules de très faible poids moléculaires**

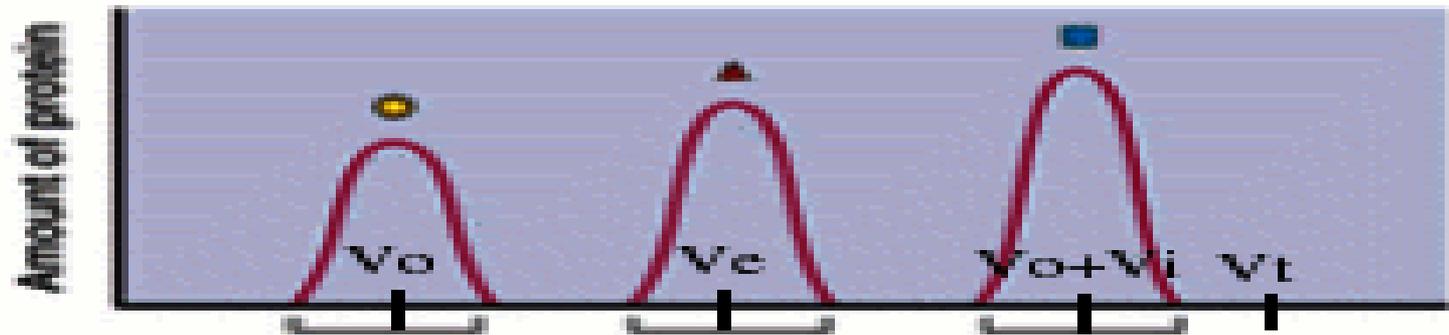
$V_t$  : volume total de la partie cylindrique de la colonne contenant le gel, donné par la hauteur de la partie concernée multipliée par la surface d'une tranche du cylindre

# Chromatographie par gel filtration

Mixture of 3 proteins



Porous beads



Molécules de haut poids moléculaire

Molécules de très faible poids moléculaire

Molécules de haut poids moléculaire intermédiaire

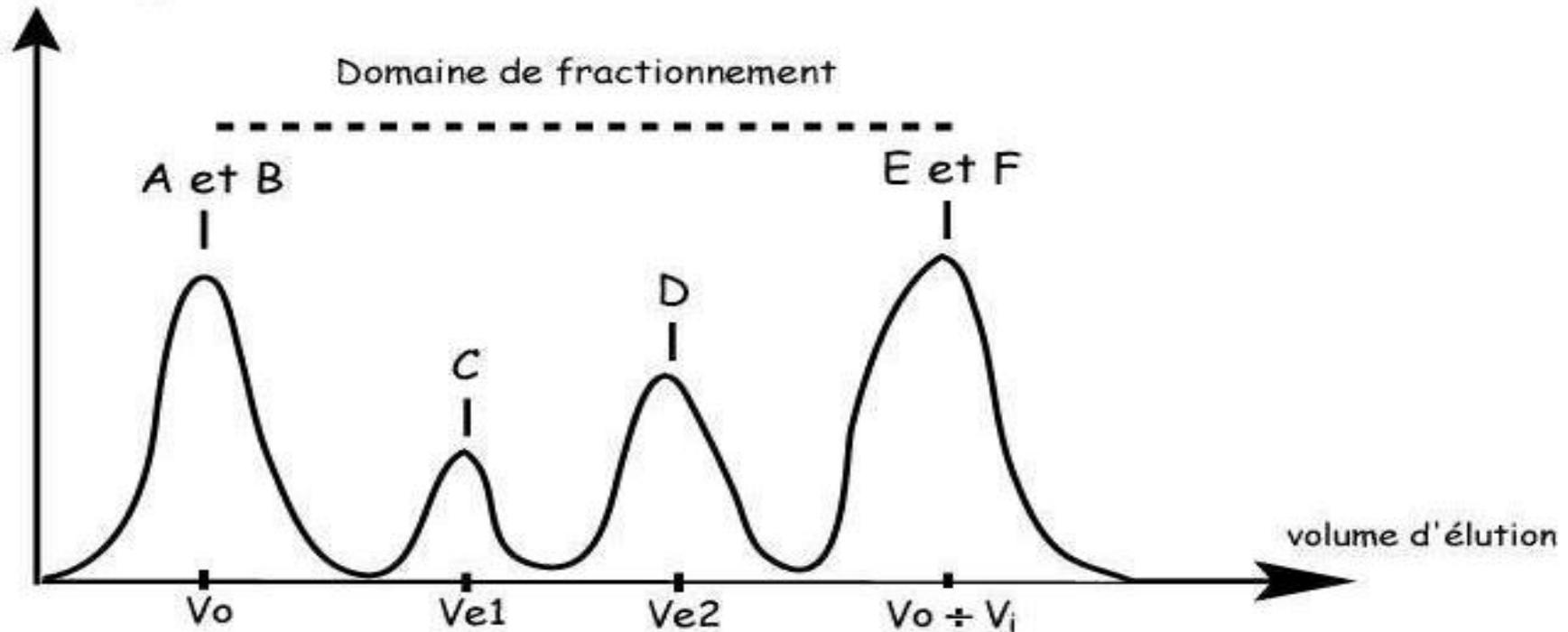
# Exemple

ex : - colonne de gel dont le domaine de fractionnement est de 5000 Da à 20 000 Da

- dépôt d'un mélange de protéines :

A = 100 kDa, B = 20 kDa, C = 10 kDa, D = 7 kDa, E = 5 kDa et F = 2 kDa

Quantité de protéines



masses molaires supérieures

à la limite supérieure du domaine  
de fractionnement

A et B passent entre les grains

masses molaires < à la limite

inf du domaine de fractionnement

E et F empruntent le chemin total à l'extérieur  
et à l'intérieur des grains

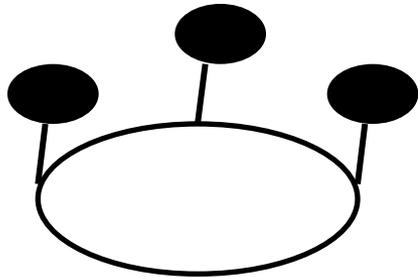
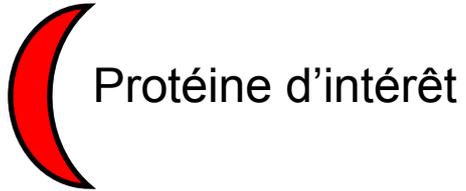
## II. Chromatographie d'affinité

- ✓ C'est la capacité des protéines à **fixer solidement des molécules (ligand) par interactions**. Le ligand est lié par covalence à un support
- ✓ Après dépôt du mélange, toutes les protéines non spécifiques de ce ligand vont être éluées alors que l'affinité **Protéine-ligand** va permettre la fixation de la protéine d'intérêt
- ✓ En modifiant le tampon d'éluion, on pourra décrocher la protéine désirée et la récupérer sous forme très pure.
- ✓ Donc on exploite les propriétés biochimiques uniques de la protéine désirée.

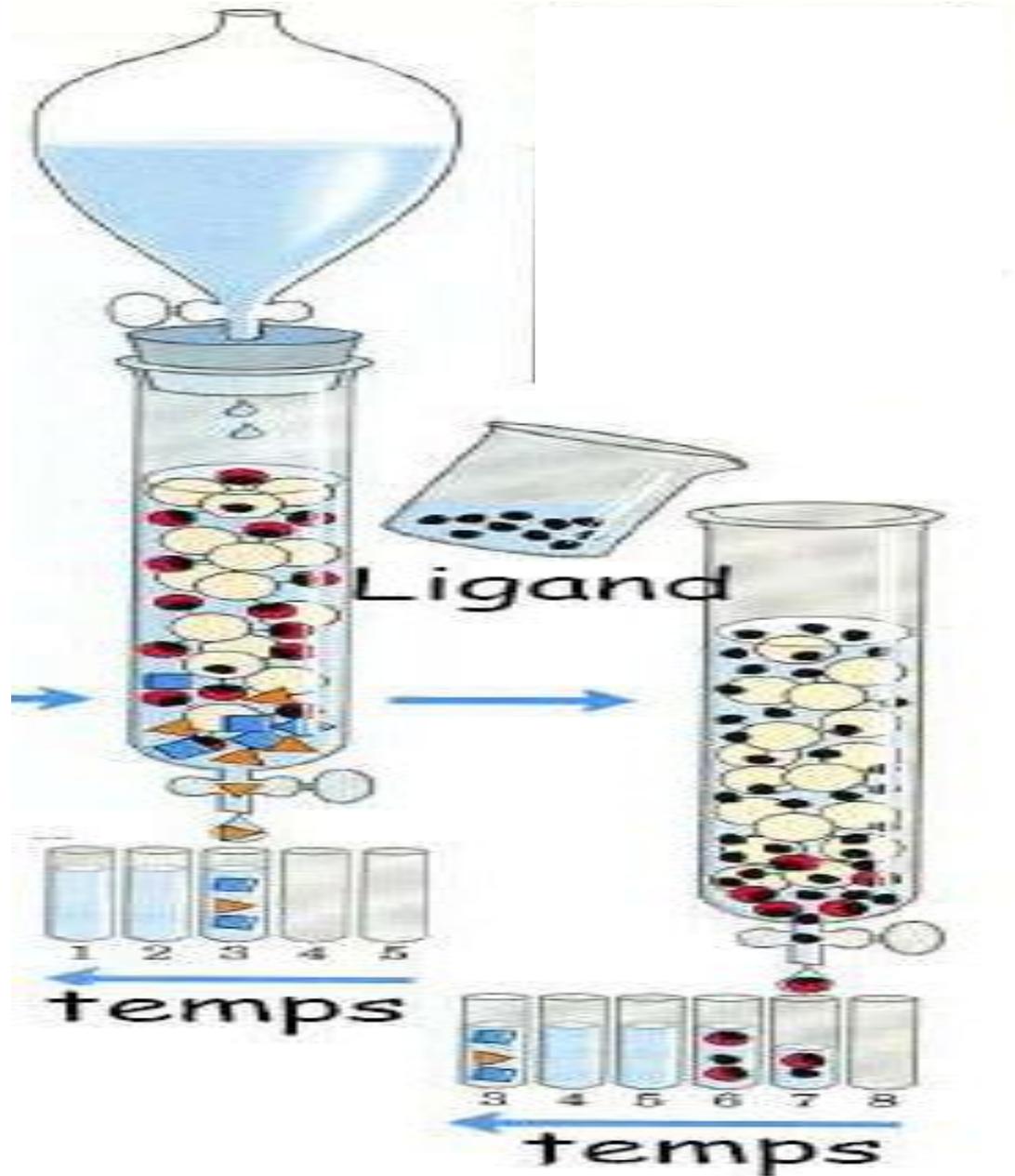
Pour détacher la protéine fixée, l'éluion peut se faire avec :

- ✓ Une solution du ligand en excès
- ✓ Une solution d'une molécule d'affinité supérieure pour la protéine que le ligand du support
- ✓ Changer le pH, force ionique et/ou température.

# Chromatographie d'affinité



Ligand couplé à la bille du polymère



## Exemple:

**Protéine fusion** : Une protéine **taguée**: protéine disposant **d'une étiquette**

- **Etiquette Glutathion S-transférase (GST) (30KD)**
- Etiquette Histidine (6 His au début ou à la fin de la protéine fusion)
- Etiquette thrombine (6 AA)

La purification des GST-protéines se fait sur colonne de **glutathion (GSH)**  
Seule la protéine recombinante (GST-tag) se lie sur le glutathion de la colonne et est éluée spécifiquement par **le GSH libre**: la GST est ensuite éliminée par la thrombine car au cours de la fusion un **site de coupure thrombine a été placé après la GST**

**Etape 1:** Fixation spécifique de la protéine de fusion par l'interaction GST/GSH



**Etape 2:** élution de la protéine de fusion par compétition avec le **GSH en solution libre**

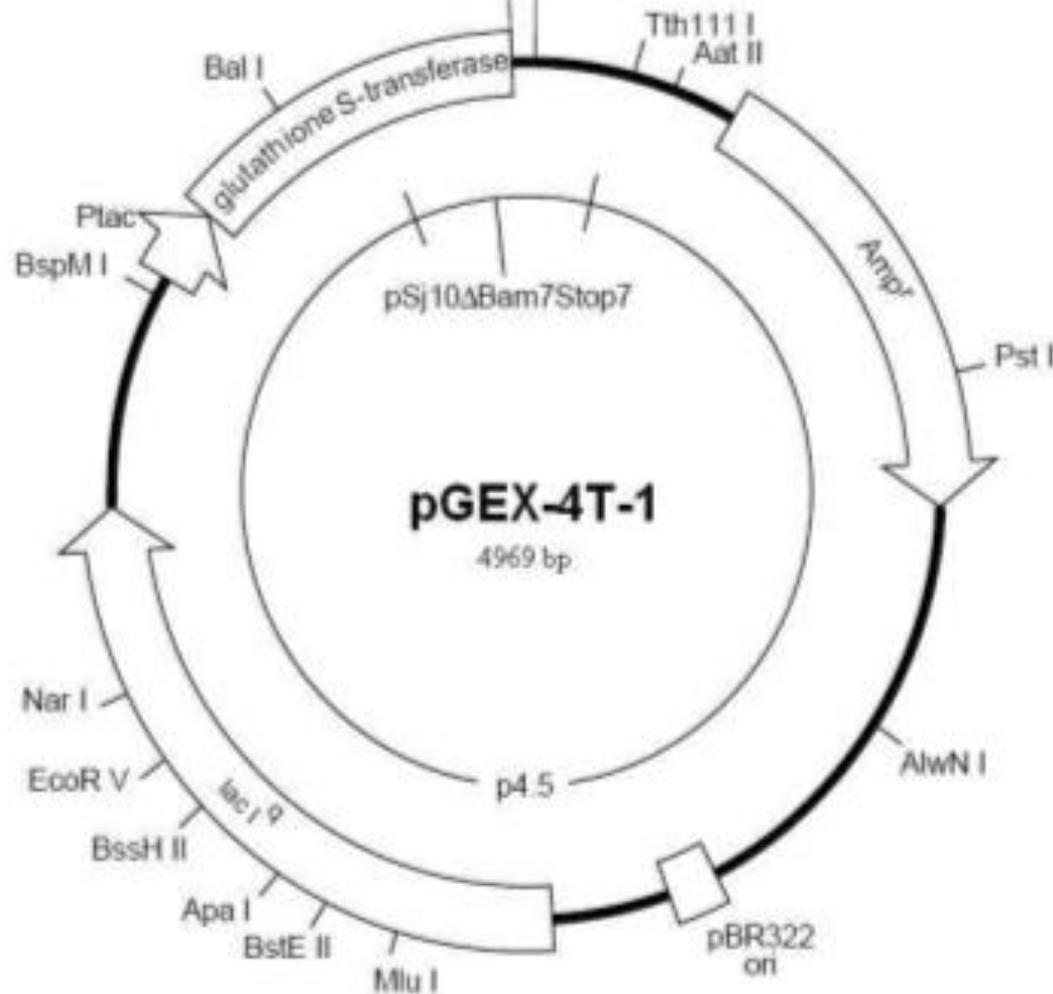


**Etape 3:** libération de la protéine recombinante par clivage de la GST par la thrombine



Thrombin

Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Ser	Pro	Glu	Phe	Pro	Gly	Arg	Leu	Glu	Arg	Pro	His	Arg	Asp	
CTG	GTT	CCG	CGT	GGA	TCC	CCG	GAA	TTC	CCG	GGT	CGA	CTC	GAG	CGG	CCG	CAT	CGT	GAC	TGA
				BamH I			EcoR I		Sma I		Sal I		Xho I		Not I				Stop codons



### III. Chromatographie d'échange d'ions

Méthode fondée sur la séparation des protéines en fonction de leur charge électrique à un pH donné

Les protéines ont un pouvoir d'ionisation **positive ou négative** de la chaîne latérale de nombreux résidus d'acides aminés, ainsi que des extrémités N- et C- terminales.

A un pH égale au point-iso-électrique (pHi) la protéine est globalement **neutre**, portant autant de charges négatives que positives:

A un **pH supérieur à son pHi**, la protéine **s'ionise négativement** et peut se fixer par attraction électrostatique sur une résine chargée positivement = **chromatographie échangeuse d'anion**

A un **pH inférieur à son pHi**, la protéine **s'ionise positivement** et peut se fixer par attraction électrostatique sur une résine chargée négativement = **chromatographie échangeuse de cation**

# A. Echangeuse anionique

Utilisation d'une résine basique faible : **particules de cellulose + Diethylaminoethyl (DEAE)** pour les échangeurs anioniques faibles

Utilisation d'une résine basique forte : **particules de cellulose + sels d'ammoniums quaternaires** 'quaternaire amino-ethyle' (**QAE**) pour des échangeurs d'anions forts.

## Exemple:

A **pH 8**, les **protéines acides** ( $p_i < 7$ ) s'ionisent négativement et vont se fixer sur la **résine positive**. Les protéines neutres ou basiques (chargées positivement) ne vont pas se fixer

Pour éluer les protéines fixées:

✓ **Diminuer le pH**: s'ionisant positivement au-dessous de leur pI, les protéines ne pourront plus assurer leur fixation à la résine, elles sortent de la colonne pendant la phase d'élution

✓ Soit appliquer **un gradient de sel (NaCl)** pour réaliser l'échange d'ions: les ions **Cl<sup>-</sup>** entrent en **Compétition avec les protéines** qui peu à peu se décrocheront de la résine

## B. Echangeuse cationique

Utilisation des **résines acides faible** : (**Carboxyméthyle 'CM'**) pour les échangeurs de **cations faibles**

Utilisation d'une résine forte : (**sulfopropyle**) pour les échangeurs de **forts cations**

A pH 5, les protéines basiques  $pH_i > 7$ , s'ionisent positivement et vont se fixer sur la résine Négative. Les protéines neutres ou acides (chargées négativement) ne vont pas se fixer et éluent de la colonne

Pour éluer les protéines fixées on utilise:

✓ **Augmentation du pH** les protéines s'ionisent négativement au dessus de leur  $pH_i$ , les protéines ne pourront plus assurer leur fixation à la résine : elles sortent de la colonne pendant la phase d'élution

✓ Appliquer un gradient de NaCl, mais ici ce sont les ions **Na<sup>+</sup>** qui vont entrer en compétition avec les protéines chargées positivement et vont jouer le rôle de **contre-ions**

Les protéines éluent dans un gradient dans l'ordre des  $pH_i$  croissants, les plus alcalines en dernier

## **IV. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

L'HPLC est pratiquée avec des colonnes à haute résolution.

Nécessite l'emploi d'un appareillage lourd dont le fonctionnement est contrôlé par ordinateur.

### **Nombreux avantages :**

- ✓ Analyse des très petites quantités
- ✓ Extrême sensibilité
- ✓ Grand pouvoir de séparation ;
- ✓ Excellente reproductibilité.

## VI. Électrophorèse

➤ L'électrophorèse regroupe un ensemble de techniques qui utilisent la propriété qu'une **molécule chargée** qui se déplace à une vitesse caractéristique sous l'action d'un **champ électrique donné**

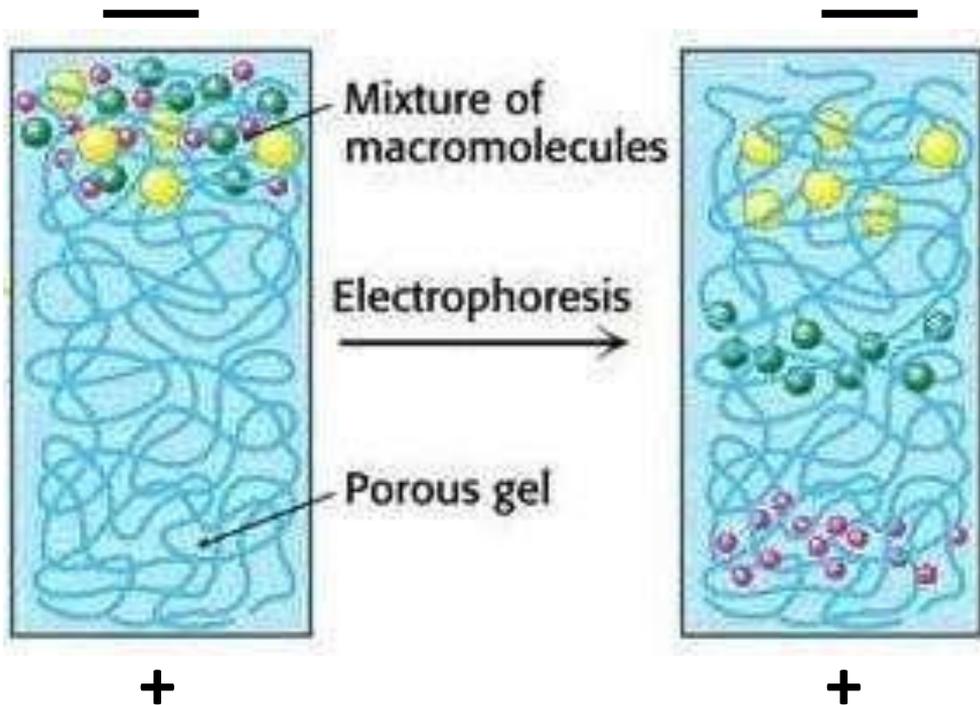
➤ Deux techniques sont très utilisées :

- **Électrophorèse sur gel de polyacrylamide**
- **Focalisation isoélectrique (IF)**

# VI.1 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

- C'est une méthode très utilisée pour la séparation de **macromolécules** telles que **les protéines**

- Les gels utilisés permettent une filtration des molécules selon **leur taille** car les pores de ces gels sont de dimensions moléculaires : les molécules les plus volumineuses entreront en collision avec le gel plus souvent et seront par conséquent ralenties alors que les molécules plus petites migreront plus rapidement dans le gel.

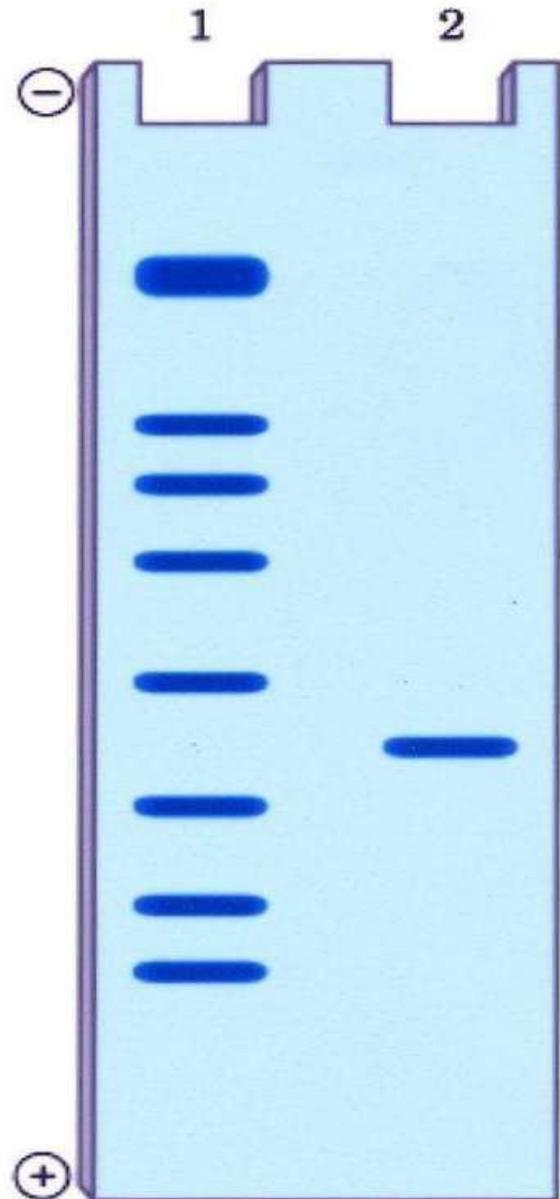
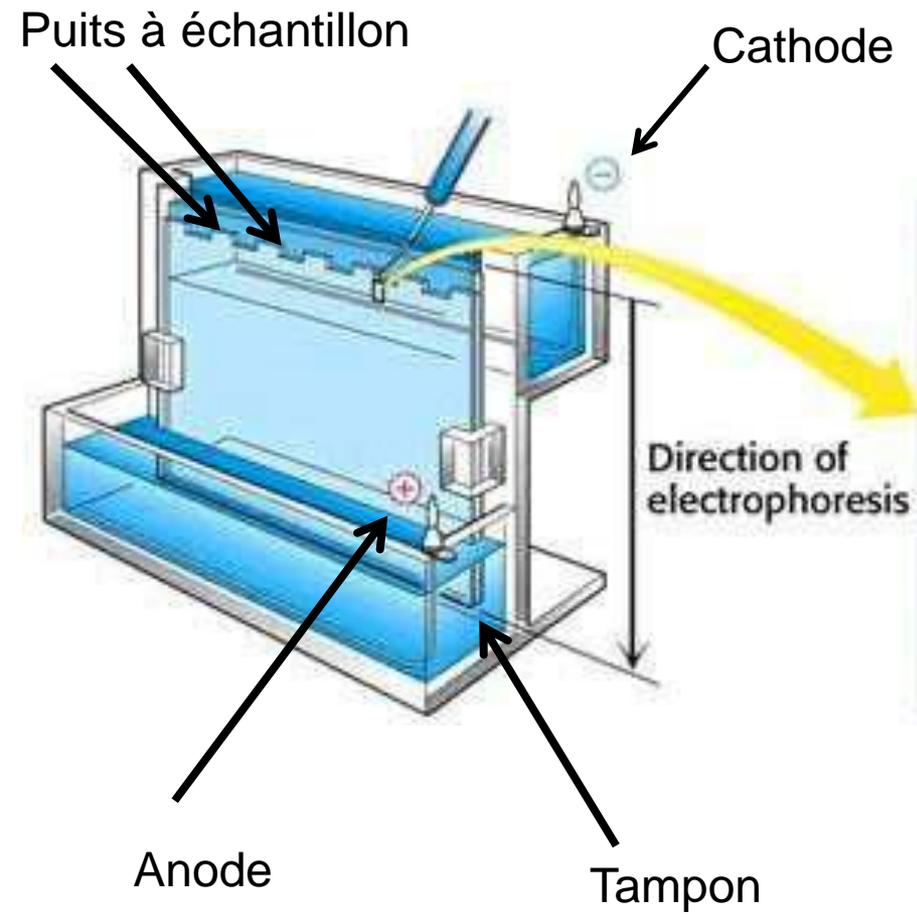


La séparation repose ici sur les mobilités relatives dans le gel et qui dépendent :

- ✓ **De la taille des protéines**
- ✓ **De la charge nette des protéines**

# Appareil à électrophorèse

La migration « verticale »: sur un support solide constitué d'un gel poreux immergé dans un tampon



# Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives (PAGE)

→ Les protéines ne sont pas dénaturées; elles conservent leur structure III aire et IV aire.

→ fonctionnalité préservée

→ **Problème** : la charge sera fonction du pH du milieu, la séparation se fera donc selon deux critères:

la masse et la charge

→ pour éviter ce problème, utilisation d'un pH très basique (8,8), pH auquel la majeure partie des protéine est chargée négativement ( $\text{pH} < 8,8$ ) et d'un gradient d'acrylamide:

→ **Applications** : détermination de la masse molaire de la protéine native  
Évaluation de la pureté

# Electrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (PAGE- SDS)

## Le principe :

Les protéines sont dénaturées par action d'un détergent anionique le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate)  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{10} - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{SO}_3^-, \text{Na}^+$

Le SDS forme des micelles autour des protéines → charge négative globale

## → **Avantage :**

- migration des protéines vers l'anode
- séparation uniquement en fonction de la taille

Pour dénaturer les protéines, on utilise à la fois un détergent comme le SDS et un agent réducteur qui réduira les ponts disulfure :

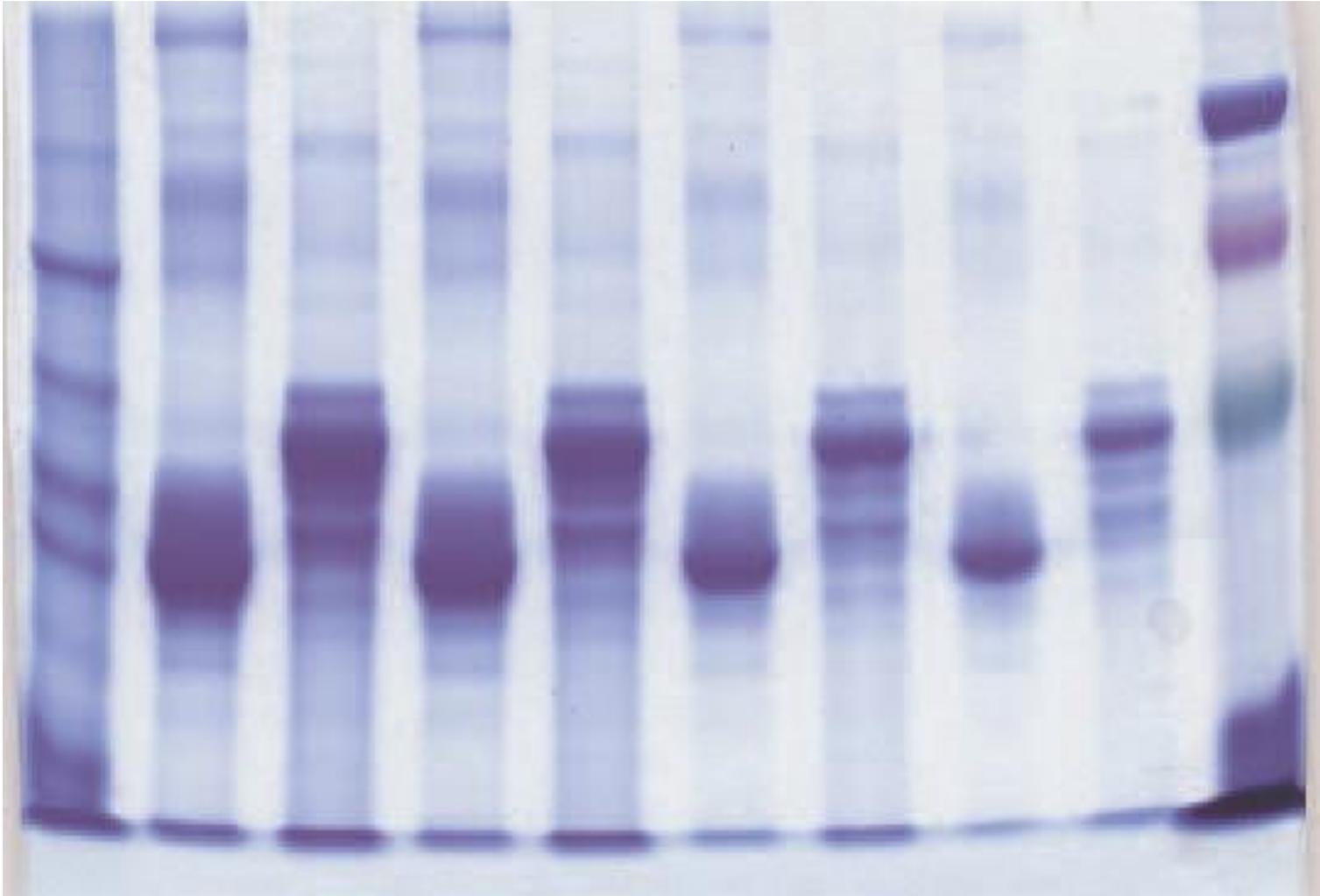
→ le  $\beta$ - mercaptoéthanol ou le dithiothréitol (DTT)

→ Coloration des protéines :

→ bleu de coomassie, ou nitrate d'argent

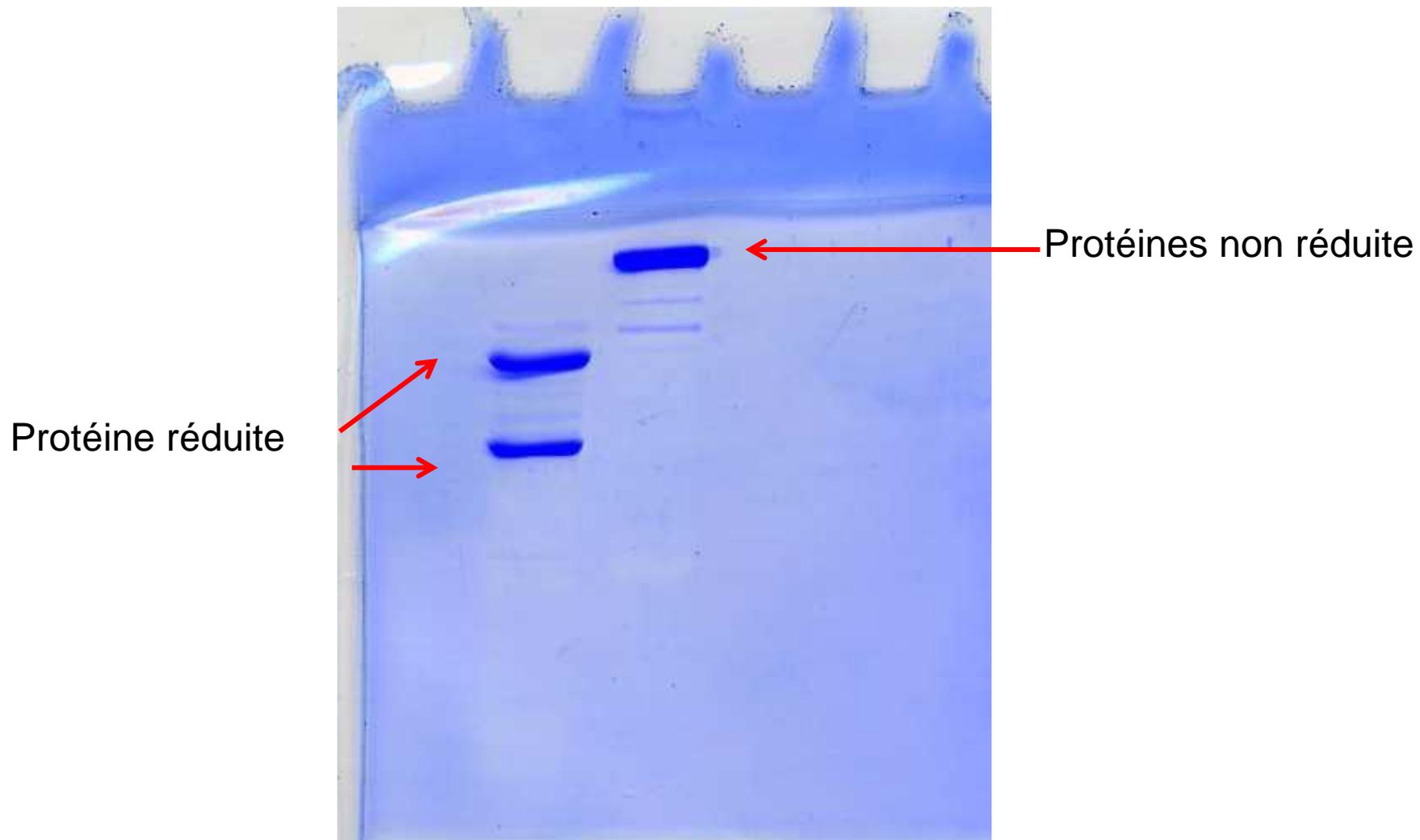
→ **Applications :** Détermination de la masse molaire de sous unités  
Évaluation de la pureté

## Coloration des protéines au bleu de coomassie

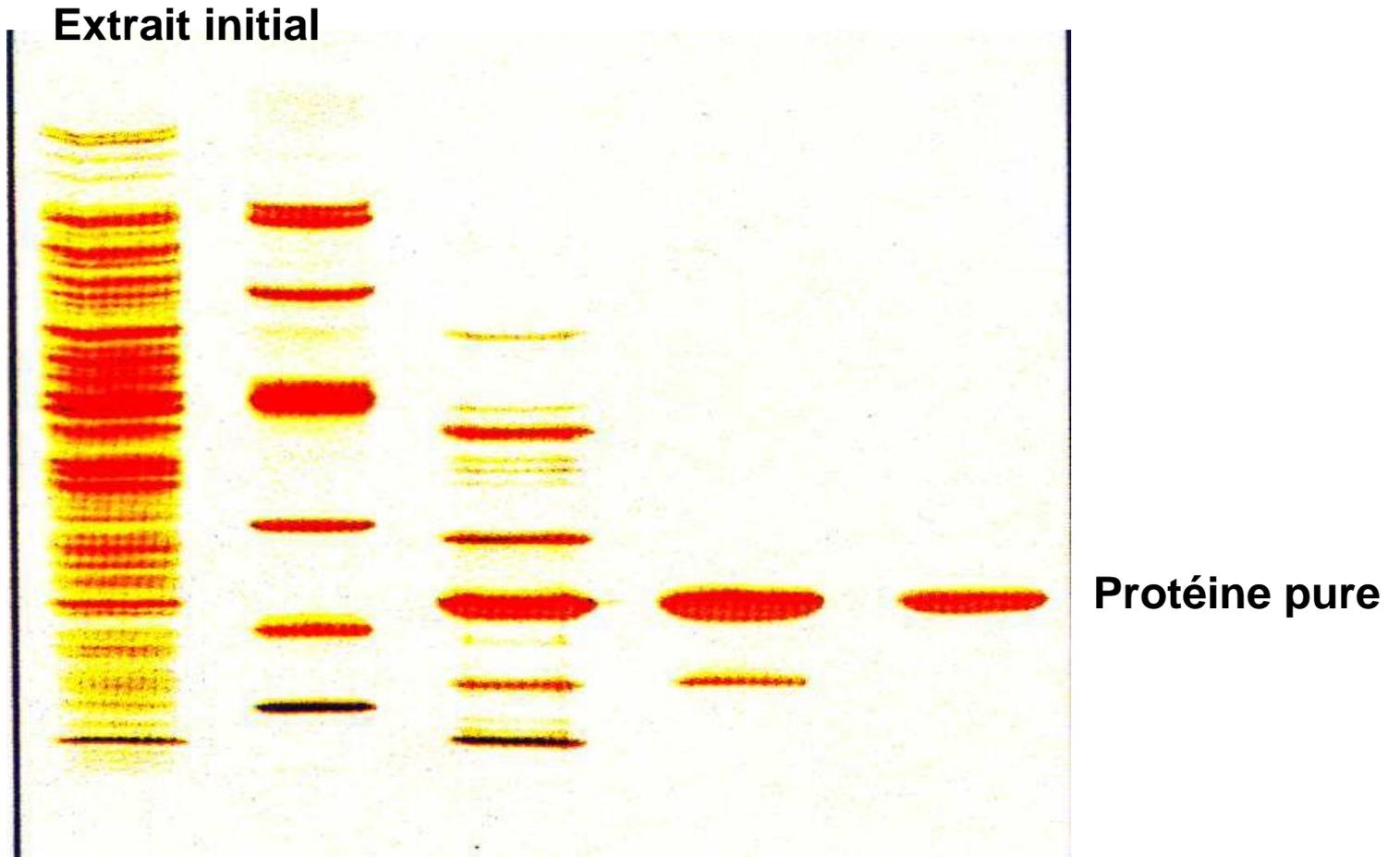


**Gel de polyacrylamide**  
**Sensibilité 0.05 $\mu$ g**

Mise en évidence des sous unités d'une protéines après réduction des ponts disulfures  
Par action du **DTT**



# Coloration à l'argent



Gel de polyacrylamide  
Sensibilité 0.05 $\mu$ g

**Université Frères Mentouri Constantine 1**

**Faculté SNV**

**Département de Microbiologie**

# ***Rôle d'*Agrobacterium tumefaciens* dans la transgénèse***

**Support pédagogique destiné aux étudiants Master 2, spécialité Ecologie Microbienne**

***Réalisée par le P<sup>R</sup> Alatou R.***

## ***Introduction***

La transgénèse chez les végétaux résulte du transfert, de l'insertion stable et héritable de gène (s) dans le génome de cellules végétales. Elle a pour objectif, par exemple, l'expression de caractères nouveaux dans une plante, ou la suppression de l'expression de certains caractères de la plante. En général, la plante transgénique est obtenue par transfert du gène (ou des gènes) dans des cellules végétales, suivie de la régénération d'une plante entière et de la sélection des plantes transformées. Le critère de sélection est la conservation des caractéristiques initiales de la plante associée à l'expression du caractère attendu.

Trois éléments sont nécessaires pour générer une plante transgénique :

- un ou plusieurs gènes à transférer ;
- un vecteur permettant d'introduire l'ADN à transférer dans la cellule végétale ;
- une cellule végétale capable d'être régénérée en plante entière.

### **1.1 Principe et fonctionnement au niveau cellulaire et moléculaire.**

L'identification d'un ou plusieurs gènes d'intérêt à introduire dans le génome d'une plante pour lui conférer les propriétés voulues, est une étape préalable à la transgénèse. Par exemple il peut s'agir d'un gène permettant la résistance à certains insectes ou à certaines maladies, la tolérance à un ou des herbicides, l'ajout d'un caractère d'intérêt nutritionnel ou d'un caractère d'adaptation à des conditions climatiques particulières, ou encore l'expression de protéines à usage thérapeutique... Les gènes introduits peuvent donc être d'origine végétale, animale, virale, bactérienne, fongique, ou synthétique

- La première étape, après identification de l'organisme donneur, consiste à intégrer le gène d'intérêt dans une construction génétique associant parfois un gène marqueur. Ce marqueur permet de sélectionner aisément les cellules qui ont intégré le gène d'intérêt.

- La deuxième étape consiste à transférer la construction génétique dans une cellule végétale. Il existe différentes méthodes :

- les méthodes dites directes comme la biolistique, qui consiste à bombarder les cellules de la plante par des particules de tungstène ou d'or, de diamètre micrométrique, elles-mêmes enrobées d'ADN ; ou par introduction d'ADN dans des protoplastes (cellule végétale sans paroi pectocellulosique) par action d'un agent chimique ou d'un champ électrique

(électroporation). Il faut ensuite parvenir à régénérer une plante entière à partir de cette cellule végétale transformée.

- les méthodes dites indirectes, utilisent des agents bactériens, le vecteur le plus souvent utilisé est la forme désarmée d'*Agrobacterium tumefaciens*

## 2. Historique

Dès le début des années 70 des progrès décisifs dans deux domaines d'investigation vont apporter les éléments techniques véritablement déterminants pour le génie génétique :

- La capacité effective de régénérer des plantes fertiles "en masse" à partir de culture *in vitro* de protoplastes isolés de feuilles sur le tabac (Nitsch et Ohyama, 1971). Cette vérification expérimentale éclatante de la totipotence des cellules végétales sera ultérieurement étendue à de nombreuses espèces végétales (Davey *et al.*, 2005).

- La découverte des plasmides de bactéries, et la caractérisation de leur rôle essentiel dans les processus naturels de transfert de gènes chez les bactéries (Cohen *et al.*, 1970).

L'utilisation expérimentale des plasmides constitue effectivement l'un des tournants décisifs pour la microbiologie, mais aussi pour le génie génétique appliqué aux plantes pour deux raisons essentielles

- En premier lieu, pour un aspect technique qui reposait sur la sélection par les gènes marqueurs utilisés chez les bactéries. Les gènes de résistance aux antibiotiques, pour la plupart directement efficaces pour les cellules végétales, ont été très utiles pour les premières mises au point des processus de transfert de gènes aux plantes (Barton *et al.*, 1983; Herrera-Estrella *et al.*, 1983).
- En second lieu, la révélation de la présence de plasmides variés chez la majorité des bactéries a renouvelé de façon lumineuse la façon d'étudier la bactérie du sol *Agrobacterium tumefaciens*, suspectée, en raison d'indications indirectes, de la capacité de transférer des gènes aux plantes. Ces bactéries découvertes à la fin du 19ème siècle sont les agents responsables de la maladie de la "**Galle du collet**" **qui résulte de la croissance anormale des tissus de la plante infectée au site de**

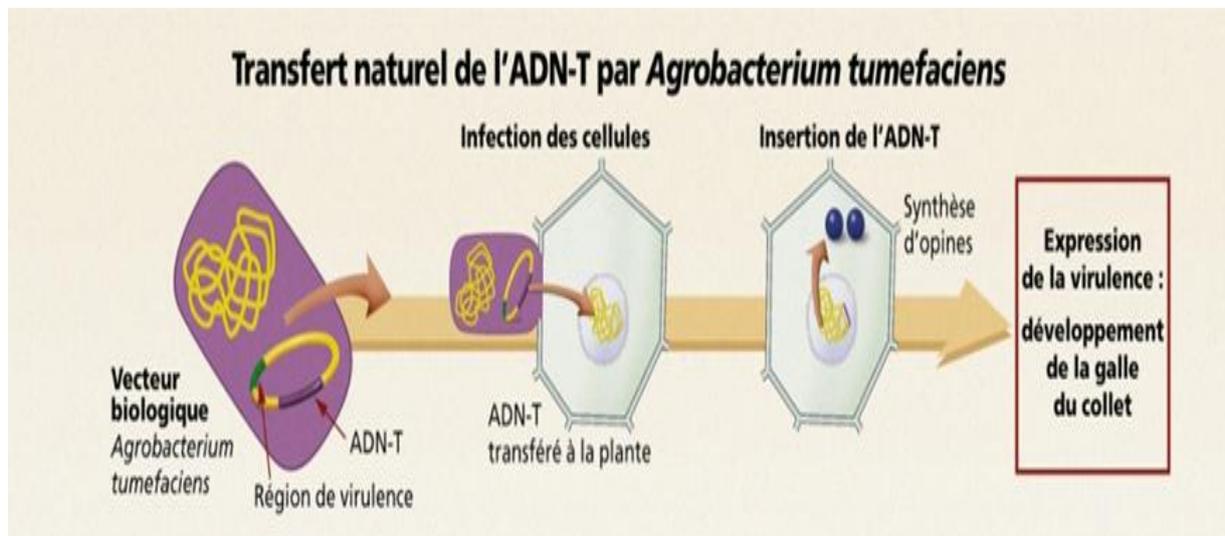
**blesure** (Smith et Townsend, 1907). En 1907, à partir d'un fragment de galle développée sur une plante, ces deux chercheurs américains ont isolé l'agent pathogène *Agrobacterium tumefaciens*

**En 1941**, deux autres chercheurs américains, ont démontré que les cellules issues de galles du collet sont des cellules cancéreuses. En effet, même en absence d'*Agrobacterium* elles prolifèrent facilement et indéfiniment sur des milieux de culture dépourvus de facteurs de croissance, milieux qui ne permettent pas la croissance de cellules saines. Donc les chercheurs ont déduits l'existence d'un principe inducteur de tumeur

- Ces bactéries ont été étudiées pendant tout le 20ème siècle par les spécialistes de la culture *in vitro* de tissus végétaux, en raison de l'aptitude de ces tissus de "galle" de se développer *in vitro* en absence de substances de croissance, contrairement à la majorité des tissus végétaux qui nécessitent auxine et cytokinine pour se développer de façon continue *in vitro*. 1950, deux groupes de chercheurs français identifient des composés spécifiques des cellules de galle '**Les opines**'. Plus intrigant, ces opines synthétisées par les tissus des plantes, servent de sources de carbone et d'azote spécifiques pour les bactéries initiatrices des galles, ce qui avait conduit à l'hypothèse d'un transfert de gènes des bactéries vers les cellules végétales "transformées" (Braun, 1947 ; Petit et Tourneur, 1972).

Cette hypothèse hardie pour l'époque, a été parfaitement confirmée après la mise en évidence d'un plasmide de grande taille, le plasmide **Ti (tumor inducing)** spécifique d'*Agrobacterium tumefaciens*, puis la révélation de son rôle dans la formation des "tumeurs" de plantes (Van Larebeke *et al.*, 1975). Depuis lors, les différentes phases du processus de transfert de gènes ont été élucidées. Le processus naturel et sophistiqué déployé par ces micro-organismes consiste à réorienter le métabolisme des cellules végétales, afin de favoriser la nutrition et la sexualité des agrobactéries initiatrices. Le processus repose sur un ensemble coordonné de dispositifs qui résultent du transfert spécifique vers les noyaux des cellules végétales d'une **portion de plasmide, L'ADN -T (transféré)** qui comporte un ensemble de gènes fonctionnels dans un environnement végétal (pour revue Zupan *et al.*, 2000 ; Gelvin, 2003).

C'est ce système naturel de transfert qui permettra les premiers transferts expérimentaux de gènes aux cellules de tabac, puis la régénération des premières plantes transgéniques expérimentales (Barton *et al.*, 1983; Herrera-Estrella *et al.*, 1983).



**Figure 1: Processus de modification végétale grâce à l'Agrobacterium**

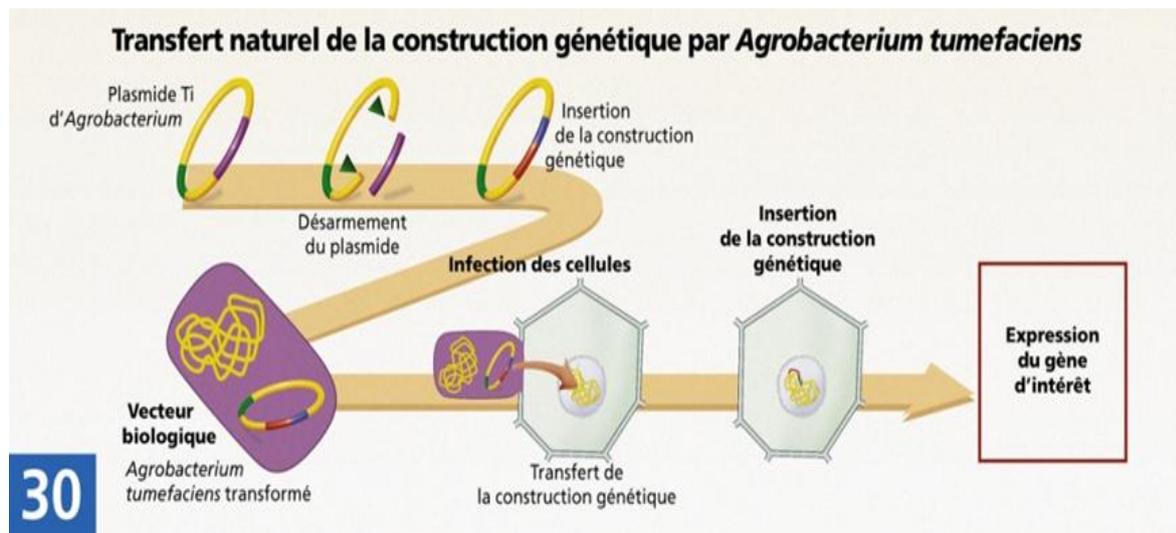
### **3. Définition d'*Agrobacterium tumefaciens***

d'*Agrobacterium tumefaciens* est une bactérie à Gram négative, très répandue retrouvée naturellement dans le sol. Elle est considérée comme un pathogène des plantes, identifiée à partir de galle en 1907.

### **4. Utilisation des vecteurs naturels d'*Agrobacterium***

Les agrobactéries du sol (*A. tumefaciens* et *A. rhizogenes*) ont acquis la capacité de dévier le métabolisme des cellules végétales pour leur bénéfice, grâce à un mécanisme complexe de transfert vers les cellules cibles d'un ensemble de gènes (ADN-T) dont les produits participent conjointement à la production en masse d'opines. Ces opines (condensation acide aminé-sucre ou acide organique-acide aminé) constituent à la fois des sources de carbone et d'azote pour les agrobactéries, mais aussi des inducteurs de conjugaison (revue Zupan *et al.*, 2000 ;

Gelvin,2003).



En résumé, les différentes étapes naturelles du transfert de l'ADN-T sont contrôlées par au moins 40 à 50 gènes qualifiés de gènes de virulence, dont certains sont portés par les chromosomes de la bactérie, mais la majorité sont localisés sur des plasmides de taille importante (200 à 300 kb), les plasmides Ti ou Ri (root inducing). Ces gènes de virulence sont naturellement induits par des substances diffusées dans le sol par des cellules végétales blessées. Les gènes **vir** sont activés par trois types de signaux chimiques que la plante relâche en cas de blessure. Ils sont 1/ composés phénoliques dérivés du syringol (acétosyringone). 2/ monosaccharides tels que glucose et acide glucuronique et 3/ pH acide. qui stimulent un activateur de transcription à deux constituants (**Vir A+Vir G**) spécifique pour l'ensemble des gènes de virulence.

Le processus déployé par ces bactéries résulte pour l'essentiel de l'évolution d'un complexe (au moins 11 protéines) de sécrétion de protéine, rendu efficace pour la sécrétion d'un complexe nucléo-protéique. D'autres éléments importants des gènes de virulence sont des nucléases spécifiques de séquences de 24 paires de bases qui encadrent les gènes de l'ADN-T :

- **La nucléase VirD2** parexemple excise l'ADN-T simple brin du plasmide Ti en restant fixée à l'extrémité 5' afin de la protéger et de "conduire" l'ADN-T au noyau des cellules cibles.
- **La protéine VirE2** qui est spécifiquement associée à l'ADN-T simple brin afin également de le protéger de nucléases végétales et de le maintenir dans une forme

linéaire afin de faciliter les étapes du transfert de la cellule bactérienne vers le noyau de la cellule cible.

Il est important de bien noter ici que les agrobactéries ne constituent pas à proprement parler un système de transfert de gènes, les fonctions que nous venons de survoler ne comportent pas le contrôle de l'intégration de l'ADN, qui semble entièrement dépendre d'activités de réparation de l'ADN de la plante receveuse ( Li *et al.*, 2005). Le dispositif mis en place par les agrobactéries conduit à un fléchage très efficace de l'ADN-T vers les noyaux végétaux dans lesquels il est rapidement converti en ADN double brin, puis exprimé. Les bactéries tirent alors bénéfice de la production d'opines, qui résulte de l'expression transitoire de l'ADN-T.

L'insertion dans les chromosomes de plantes, conséquence accessoire, peut se produire avec une bonne fréquence en raison des quantités importantes d'ADN-T présentes dans les noyaux. Ce fléchage très efficace, associé à la capacité des bactéries de s'infiltrer dans les tissus végétaux, fournit d'ailleurs la possibilité d'utiliser les agrobactéries pour des expériences d'expression transitoire systémique *in situ* soit en inoculant des feuilles (Marillonnet *et al.*, 2005), ou des fruits (Orzaez *et al.*, 2006) ce qui complète les dispositifs utilisant des protoplastes.

Le trempage des fleurs dans une solution d' *Agrobacterium tumefaciens* , est une méthode qui présente l'intérêt d'intégrer le transgène dans les cellules germinantes ( pollen et ovules) et donc d'obtenir une descendance transgénique. La transformation de cellules végétales indifférenciées en culture « cals » par *Agrobacterium* , il faut par la suite générer des plantes à partir de ces cals . Les cellules sont multipliées *in vitro* sur des milieux de cultures puis des plantes entières sont générées par des techniques classiques.

## **5. Le système binaire**

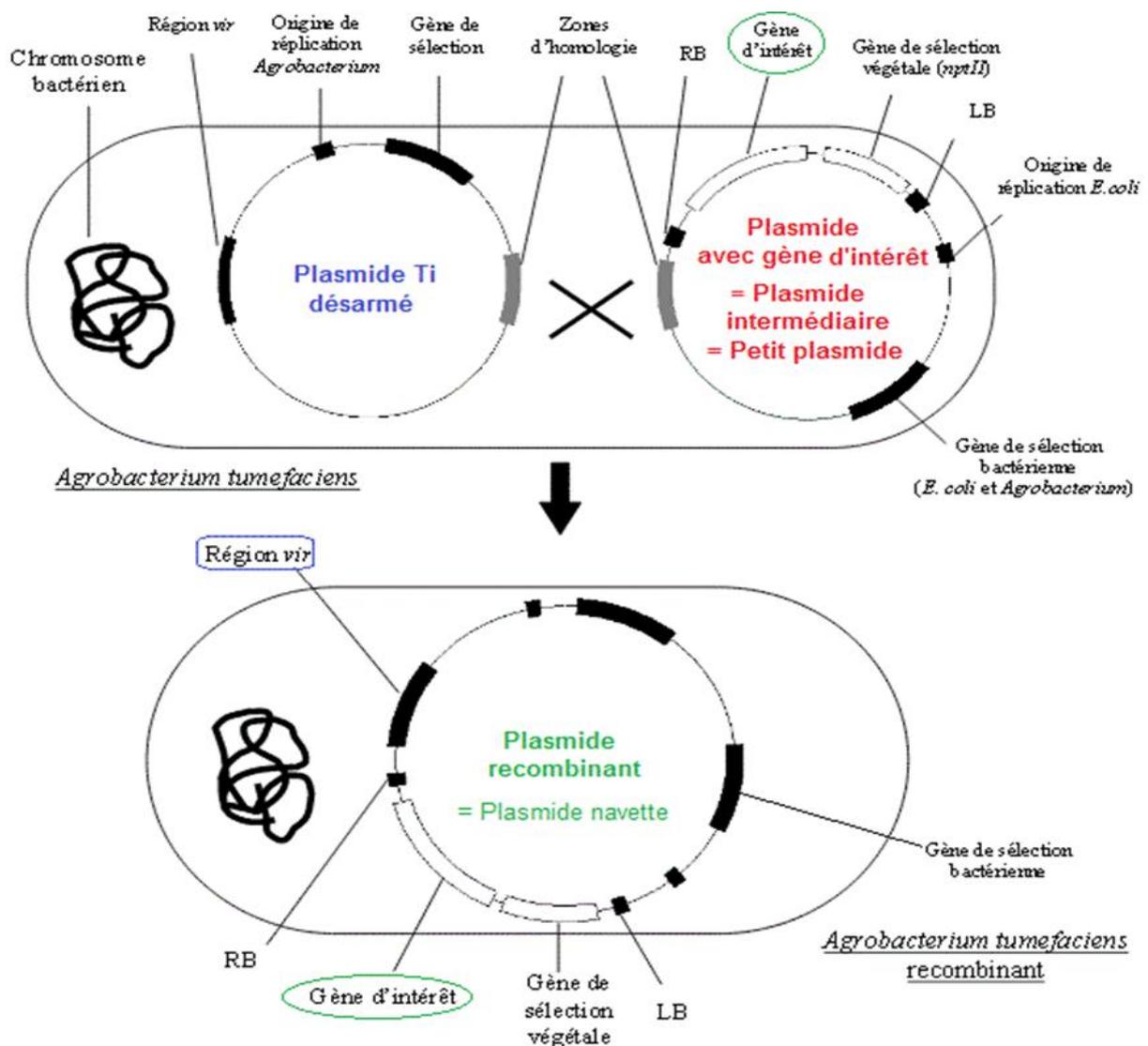
La pratique du transfert de gènes chez les plantes débute par la démonstration expérimentale que les gènes "marqueurs" insérés dans l'ADN-T (associés aux séquences de contrôle de l'expression de plante), sont effectivement transférés et intégrés dans le génome des cellules cibles (Barton *et al.*, 1983; Herrera-Estrella *et al.*, 1983). Cependant, la taille et la complexité des plasmides Ri ou Ti, constituaient des obstacles à leur utilisation pratique. Pour les utilisations routinières des agrobactéries, deux informations se sont révélés cruciales : l'ADNT ne comporte pas de gènes actifs dans le processus même de transfert d'ADN, et surtout les

seuls éléments essentiels sont les deux séquences répétées, de 24 paires de bases, qui bordent l'ADN-T et qui constituent les sites d'excision de l'ADN-T simple brin destiné à être exporté vers les cellules végétales.

La démonstration que les nucléases d'excision, et toutes les protéines du processus de transfert, étaient actives sur ces séquences insérées dans des plasmides de *E. coli*, a permis d'utiliser ces plasmides bien connus dans des systèmes désormais qualifiés de systèmes binaires (Hoekema *et al.*, 1983; de Frammond *et al.*, 1983).

Généralement, ces systèmes sont constitués d'une agrobactérie, le plus souvent résistante à l'rifampicine, qui porte les gènes chromosomiques d'attachement à la paroi végétale, et comporte un plasmide Ti (déléte de l'ADN-T natif, mais complété par un gène de résistance à un antibiotique) qui fournit les gènes de virulence contrôlant le transfert. Ce système est complété par un plasmide de *E. coli* qui comporte une origine de répllication fonctionnelle à la fois dans *E. coli* et dans les agrobactéries, une résistance à un autre antibiotique, ainsi que les constructions à transférer dans des sites de clonage encadrées par les séquences bordures de l'ADN -T.

Le plasmide Ti qui contient la région vir est maintenu dans *Agrobacterium tumefaciens*. Un plasmide intermédiaire de *E. coli* est utilisé pour faciliter le transfert du transgène. Les séquences bordures (24 paires de bases), indispensables, sont placées sur le plasmide intermédiaire afin d'encadrer les gènes que l'on souhaite transférer aux plantes. Ce même plasmide est porteur du gène d'intérêt (+ gène de sélection végétale + gène de sélection bactérienne). Il est sélectionnable et il comporte une origine de réplication fonctionnelle chez *E. coli* et *Agrobacterium*. Il s'intègre dans le plasmide Ti par recombinaison homologue grâce à une région homologe (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. Synonyme: vecteur bifonctionnel. Ici, il contient le gène de sélection pour les bactéries (AmpR, par exemple) et le gène de sélection des plantes recombinées (KanR, par exemple).

Cette trame générale a donné lieu à de nombreuses variations et adaptations, en fonction des objectifs et des tissus cibles. Un guide très utile pour approcher cette variété repose sur une revue des systèmes binaires (Hellens *et al.*, 2000).

Pour être complet, il faut signaler que ces dispositifs de transfert par les agrobactéries sont également efficaces sur les levures (Bundock et Hooikaas, 1996), les champignons filamenteux (de Groot *et al.*, 1998) et même les cellules humaines (Kunik *et al.*, 2001).

En pratique, les bactéries hébergeant les vecteurs binaires sont cultivés sur des milieux sélectifs afin de maintenir les deux types de plasmides. Ces bactéries sont mises en contact avec les explants végétaux, pour initier le transfert de l'ADN-T. Les explants sont choisis en fonction de leurs caractéristiques et surtout de leur aptitude à la régénération de plantes, les plus utilisés sont les fragments de feuilles (Horsch *et al.*, 1985).

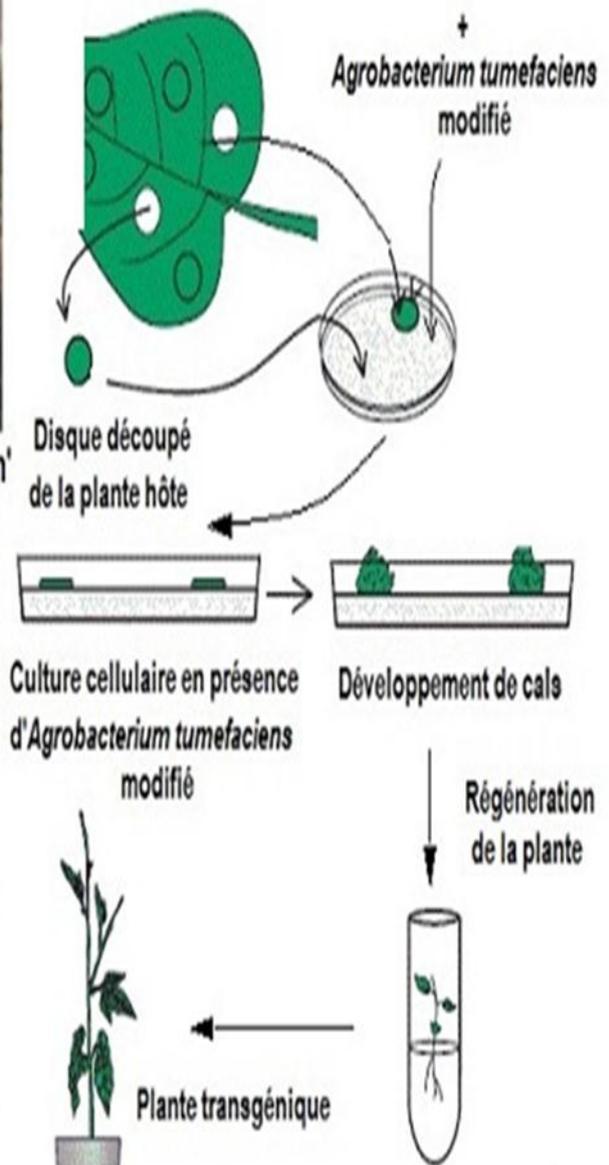
Ces explants sont incubés (ou co-cultivés) avec les agrobactéries pendant des périodes variables (de quelques heures à quelques jours) selon la souche de bactérie et la sensibilité de l'explant. Le plus fréquemment l'incubation dure 48h (Gelvin, 2003). Ensuite, les tissus végétaux sont transplantés sur des milieux de culture favorables à la régénération et généralement additionnés d'un antibiotique, non toxique pour les cellules végétales (céfotaxime, carbénicilline, augmentin), afin d'éliminer les agrobactéries (Hellens *et al.*, 2000).



Plantes. Transformation in vivo à l'aide d'un 'DNA gun'



Cultures cellulaires. Transformation in vivo à l'aide d'un 'DNA gun'



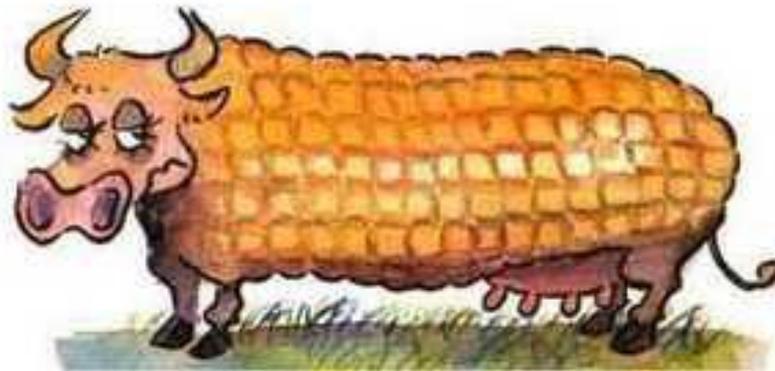
Culture des tissus de plantes. Transformation indirecte par *Agrobacterium tumefaciens* modifié

## Transgènes. Systèmes de transfert des transgènes aux plantes hôtes

# Les Organismes Génétiquement modifiés (OGM)

BOUFFER DU MAÏS TRANSGÉNIQUE  
EST-CE DANGEREUX ?

BÔF!



Support pédagogique destiné aux étudiants Master 2, spécialité Ecologie Microbienne

*Les organismes génétiquement modifiés couramment dénommés OGM suscitent craintes ou espoirs, selon le point de vue considéré. Ils sont le résultat du génie génétique par des mutations réalisées sur la molécule d'ADN, ceci à des fins commerciales et scientifiques.*

## **1. Historique**

Les OGM ne sont pas apparus du jour au lendemain. Après la découverte de la molécule d'ADN en 1944, il y a eu celle de sa structure en 1953 par Crick et Watson, et de son rôle capital dans l'acquisition de caractères propres à chaque individu. Cette molécule informative est constituée d'une succession de gènes qui codent pour des caractères donnés; la nouveauté avec les OGM consiste à introduire un gène supplémentaire et étranger pour améliorer ou seulement modifier l'individu. Le premier pas est franchi en 1972 par une équipe américaine qui réussit l'hybridation d'ADN simiesque avec celui d'une bactérie. Quant à l'homme, deux de ses gènes sont introduits dans une bactérie pour produire des hormones : la somatostatine en 1977 et l'insuline en 1978. Les années 1980 voient de nombreuses expériences de laboratoire avec l'apparition de nouveaux OGM. Ce n'est que dans les années 1990 que sont mis sur le marché des produits transgéniques, d'abord aux États-Unis et au Canada, puis timidement en Europe (colza, soja et maïs). En France c'est en novembre 1997 que la culture du maïs transgénique Novartis capable de résister à son parasite principal, la pyrale, est autorisée, mais en 2007 on interdit sa culture en France.

## **2. Nature des OGM**

N'importe quel gène étranger animal, végétal, bactérien ou même humain peut être introduit dans l'ADN d'un organisme d'une autre espèce, souvent très éloignée du donneur initial. Cette opération est appelée transgénèse, elle permet de donner un nouvel individu tout à fait original, possédant un ou plusieurs gènes obtenus en dehors de la reproduction sexuée. Ces gènes «d'intérêt» permettent l'acquisition de nouveaux caractères pour le receveur: des particularités originales apparaissent alors, complètement étrangères au sein de l'espèce, on peut ainsi, imaginer toutes sortes d'individus bizarres et transgéniques.

## **3. Les OGM sont-ils une suite « logique » de la sélection, croisement et greffe ?**

Depuis que l'homme cultive des plantes et élève des animaux, il les fait évoluer en sélectionnant ceux qui ont la meilleure productivité. Cette évolution sous forme sélection, de croisement, de greffe a permis ainsi de créer de nouvelles variétés ou races qui n'existaient pas spontanément et constituent des améliorations.

Les OGM ne constituent donc pas un changement dans la sélection des plantes pour améliorer les plantes cultivées, mais l'introduction d'une technologie particulièrement puissante et précise pour faciliter sa mise en œuvre.

Un autre avis consiste à dire que les OGM constituent un changement essentiel dans la mesure où auparavant, nous « proposons » à la Nature de créer ou non une autre espèce (la Nature pouvait dire non !). Avec les OGM, la Nature n'a pas son mot à dire. Elle est mise sur le fait accomplie. Rien ne permet de dire que les manipulations génétiques se seraient produites naturellement. Ce raisonnement amène à penser que les OGM sont un très grand changement par rapport aux méthodes de sélection, greffes et aux croisements.

#### **4. Objectifs des OGM**

##### **4.1 Meilleure qualité des aliments**

###### **a) Objectif**

-Le blé : amélioration des caractéristiques requises pour la panification.

- La pomme de terre : augmentation de la teneur en amidon pour des utilisations industrielles (purée, féculé et frites absorbant moins d'huile).

L'objectif est de fournir à des consommateurs éloignés des lieux de production des produits aux arômes développés.

-Des tomates, des melons, des bananes à maturation retardée plus savoureuses.

Par transgénèse, on introduit un gène permettant de différer le ramollissement qui accompagne le mûrissement. Ainsi, ils se conservent mieux, sont plus savoureux et contiennent plus de vitamines car ils peuvent être récoltés à un stade de maturation avancée.

###### **b) Commentaires sur cet objectif**

Le transformateur se soucie de la qualité technologique, de la composition en certains glucides, protéines ou lipides, de l'aptitude à telle ou telle transformation industrielle. Les pouvoirs publics s'intéressent à la qualité sanitaire, à l'absence de substances toxiques et à la véracité des indications mentionnées sur les étiquettes. Le distributeur recherche une belle apparence, une bonne capacité de conservation et un écoulement rapide. Quant au consommateur, il se préoccupe plutôt de la qualité organoleptique et sensorielle et, de plus en plus, des aspects santé ou du mode d'obtention des produits : certains sont sensibles au caractère dit "naturel", d'autres à une évocation d'une typicité locale (origine montagne...).

Différents aspects que recouvre la notion de qualité peuvent être modifiés par les biotechnologies et la transgénèse, par exemple la modification de la teneur en divers acides gras chez les oléagineux, l'amélioration de la capacité des productions à subir certains processus de transformation après la récolte, l'augmentation de la teneur en vitamines, etc.

Ainsi pour les uns les biotechnologies permettront une amélioration de la qualité, notamment sous l'aspect de la composition du produit, tandis qu'au contraire les opposants au génie

génétique y verront une altération, voire une disparition de celle-ci vu le mode d'obtention, perçu comme une "manipulation" trop poussée ou trop artificielle du vivant.

#### **4.2 Mieux conserver les aliments, peut avoir un certain intérêt ?**

Si aucun problème de santé n'est créé par ces aliments, pourquoi pas ? Mais sommes-nous sûr de l'innocuité de ces aliments ? Sommes-nous informés sur les études réalisées ? Sommes-nous obligé de manger des aliments provenant de milliers de kilomètres du lieu de production ? Tant que le doute persiste sur l'innocuité de tels aliments, peut-être est-il préférable de privilégier de se nourrir avec les aliments de sa région ou alors accepter qu'ils se conservent moins bien ?

Chacun est libre de prendre les risques qu'il désire... à partir du moment où il est informé des risques qu'il encourt... (nous aurons l'occasion de voir dans la suite de ce dossier que ce n'est pas forcément le cas.)

#### **4.3 Des plantes produisant des sucres et aliments « zéro calorie »**

##### **a) Objectif**

De nombreux consommateurs recherchent ces sucres afin de réduire leur ration journalière de calories apportées par l'alimentation. Ainsi, par transfert de gène, on fait produire à des betteraves un type de sucre comestible mais n'apportant aucune calorie. On peut aussi améliorer la qualité gustative de fruits ou de légumes par l'introduction d'un gène produisant une protéine naturelle sucrée (la brazzéine) sans apporter la moindre calorie. 7

##### **b) Commentaires sur cet objectif**

La Stévia : L'extrait standardisé (au moins 90 % de stéviolosides), constitué d'une poudre blanche soluble dans l'eau, est vendu tel quel. Son pouvoir édulcorant est beaucoup plus élevé que celui du sucre raffiné (de 100 à 300 fois), mais il n'apporte ni calories ni hydrates de carbone. Une cuillerée à thé de l'extrait pur posséderait un pouvoir édulcorant équivalent à environ trois tasses de sucre.

#### **4.4 La réduction des protéines allergiques dans certains aliments**

##### **a) Objectif**

De nombreuses études ont montré qu'il est possible de réduire, voire éliminer, les protéines allergisantes des céréales comme le riz et le soja. En Asie, nombreux sont les consommateurs qui souffrent d'allergie au riz. Or le riz constitue l'aliment de base de plus de deux milliards de personnes.

##### **b) Commentaires sur cet objectif**

Tout OGM est potentiellement allergisant car il n'est pas reconnu par l'organisme qui le reçoit, que ce soit par voie digestive ou par voie aérienne. Les expériences ont montré le pouvoir

allergisant du « soja à la noix » : la noix de Brésil est un aliment reconnu pour provoquer des allergies chez certains individus. Par conséquent, on a dû soumettre le soja OGM qui a été créé à partir d'un des gènes de la noix à une multitude de tests pour vérifier si la protéine produite par ce gène avait conservé son pouvoir allergène. Pour le savoir, les chercheurs ont mis en contact la dite protéine avec du sérum de patients connus pour être allergiques. On observa une réaction immunitaire immédiate. Pour cette raison, ce nouveau soja n'a pas été commercialisé, même s'il avait été développé pour l'alimentation animale mais qu'en sera-t-il pour les fraises, tomates, et autres bananes transgéniques ?

De nombreux scientifiques prétendent que l'ingestion de nourriture génétiquement modifiée est sans danger. Néanmoins, il a été récemment prouvé qu'il y a des risques potentiels liés à la consommation de tels aliments, car les nouvelles protéines qu'ils fabriquent peuvent se comporter comme des allergènes ou des toxines, altérer le métabolisme de la plante ou de l'animal à l'origine de l'aliment, l'amenant à produire de nouveaux allergènes ou toxines, ou à réduire sa qualité nutritive.

Sachant que tout OGM est potentiellement allergisant, peut-on réellement laisser penser que des OGM puissent être utilisés pour enlever les allergies d'autres aliments ? Ou alors s'ils enlèvent des allergies d'autres aliments, ne créent-ils pas eux-mêmes d'autres allergies ?

#### **4.5 Des plantes enrichies en vitamine A, fer, huiles riches en acides gras spécifiques**

##### **a) Objectif**

Aujourd'hui, un milliard de personnes souffrent de carence en vitamine A (notamment en Afrique, en Asie). Or, la vitamine A, fournie par le bêta carotène, est un élément nutritif essentiel pour la vue et la croissance.

Selon l'Unicef, la carence en fer concernerait presque 3,7 milliards de personnes aujourd'hui dans le monde, dont la majorité sont les femmes et les enfants de moins de cinq ans dans les pays en voie de développement.

Des recherches sont en cours sur la réduction de la teneur en acide gras mono-insaturés (graisses animales) contenues dans les huiles afin de limiter les risques cardio-vasculaires. Il s'agit d'introduire des gènes de désaturases dans les plantes oléagineuses comme le colza et le soja pour augmenter les proportions d'acides gras saturés. Ces acides gras sont les « bonnes graisses » indispensables à notre organisme.

L'utilisation du génie génétique pourrait permettre d'améliorer la qualité nutritionnelle des plantes utilisées en alimentation animale, en augmentant la teneur en certains acides aminés (méthionine, lysine, thréonine, tryptophane). Ces éléments, synthétisés en trop faible quantité par ces plantes, sont actuellement amenés sous forme de compléments nutritifs. De plus, l'accumulation de certaines enzymes pourrait permettre d'améliorer la digestibilité des aliments

##### **b) Commentaires sur cet objectif**

Avant toute chose, il faut prendre conscience et connaissance du fait que la présence chimique d'un ingrédient ne garantit absolument pas l'activité biologique et n'a donc pas forcément un intérêt pour l'organisme. C'est la raison pour laquelle, par exemple, de la vitamine C de synthèse n'apporte rien à l'organisme alors que de la vitamine C naturelle (qui est active) est très utile à l'organisme.

Si un médicament synthétique argue de la présence chimique de la vitamine, il ne peut proposer qu'un clone mort à l'organisme qui ne pouvant le décoder, soit l'ignorera et l'éliminera (d'où l'inefficacité des faibles doses), soit en sera fortement perturbé (d'où la toxicité des fortes doses).

Les produits naturels, par la préservation de la stéréochimie et des synergies, sont seuls à pouvoir garantir l'activité biologique de la vitamine et son utilisation optimale par l'organisme.

D'autre part, la promotion est faite de la possibilité de lutter contre la malnutrition grâce à des aliments transgéniques comme le « riz doré », enrichi en vitamines A et permettant d'éviter à des centaines de milliers d'enfants de devenir aveugles. Il faut savoir qu'aujourd'hui ce « riz de rêve » n'en est encore qu'à l'étape des essais et qu'il fait l'objet d'une controverse scientifique quant à sa réelle efficacité. De plus des problèmes de droits de propriété et de brevets restent posés quant à sa possible distribution aux populations souffrant de malnutrition. D'autres solutions plus immédiates et éprouvées existent pour lutter contre la déficience en vitamine A, mais se heurtent à des questions d'organisation de l'aide alimentaire.

#### **4.6 Des vaccins sans piqûres**

##### **a) Objectif**

Désormais, le génie génétique permet, par la modification du patrimoine génétique de plantes, de leur faire synthétiser des substances vaccinales. Il s'agira alors simplement de manger un aliment pour être vacciné contre une maladie précise. Cela présente un intérêt, notamment pour les pays du tiers monde. En effet, les chercheurs prévoient déjà d'utiliser des bananiers génétiquement modifiés pour produire ces vaccins, d'une part pour leur fécondité importante, et d'autre part parce que la banane peut être transportée et stockée sans grandes difficultés, contrairement aux vaccins actuels.

##### **b) Commentaires sur cet objectif**

Il est important de prendre connaissance du fait que certains pensent qu'il y a un risque d'intégration de l'ADN vaccinal dans le génome du vacciné, ce qui pourrait favoriser certaines maladies

#### **4.7 Des greffes d'organes d'animaux à l'homme**

##### **a) Objectif**

Les greffes d'organes sont rares, faute de donateurs, et risquées du fait de la possibilité importante de rejet. Si on ajoute à cela les problèmes d'incompatibilités entre le donneur et le receveur, on comprend la difficulté à trouver des organes pour ces interventions. Le génie génétique peut apporter des solutions. En effet, en modifiant le génotype d'animaux par

transfert de gènes humains, on peut supprimer le phénomène de rejet lors de la greffe d'un organe animal à un homme. Des résultats prometteurs ont déjà été obtenus sur des porcs transgéniques mais des raisons compréhensibles d'ordre sanitaire (transmission de virus) et éthique empêchent pour l'instant les essais cliniques chez l'homme.

#### **4.8 Substitut du sang**

##### **a) Objectif**

L'hémoglobine est une molécule clé de la respiration car elle assure le transport de l'oxygène et du gaz carbonique dans le sang au sein des globules rouges. Depuis plusieurs décennies, les scientifiques sont à la recherche d'un substitut du sang qui pourrait être stocké et transporté aisément, et pour lequel ne se poserait pas le problème de l'incompatibilité des groupes sanguins et celui du risque infectieux. Ce substitut pourrait être utilisé en cas d'urgence dans des situations de perte de sang massive.

##### **Commentaires sur cet objectif**

Il est possible de remplacer avantageusement le sang par un produit naturel (donc sans OGM) appelé le sérum de Quinton. Un vieux chien saigné à blanc pratiquement mort a été ramené à la vie après perfusion de ce liquide issu de l'eau de mer, il a vécu encore de nombreuses années.<sup>33</sup>

D'après le Dr Albert Poret, paru dans Vie et Action, la revue du Dr Passebecq : "... J'estime qu'aujourd'hui où l'on fait des abus dangereux des transfusions sanguines, particulièrement dans les services chirurgicaux, il y aurait le plus grand intérêt à les remplacer par des injections de Plasma de Quinton. On éviterait ainsi les méfaits et les drames si fréquents qui suivent les transfusions de sang. Et je n'envisage pas seulement les accidents brutaux mais aussi tous les désordres qu'entraîne le rejet des cellules étrangères, les intoxications par impuretés des humeurs des donateurs, et aussi les perturbations du psychisme et du caractère déterminées par l'introduction d'éléments hétérogènes dans un milieu vital.

Le mélange de deux sangs, s'il n'est pas mortel, est toujours nuisible pour l'âme qui absorbe des éléments animiques étrangers. Dans bien des cas où la réduction du volume sanguin est dramatique, un plasma marin de substitution ferait l'affaire, comme cela a été scientifiquement démontré par René Quinton (1866 - 1925).

#### **4.9 Usage de bactéries modifiées pour combattre le Sida**

##### **a) Objectif**

Selon le Dr Tim Farley, de l'organisation Mondiale de la santé, le principe d'une technique, telle celle-ci, qui améliore les défenses du corps contre l'HIV est une grande idée, mais il reste

beaucoup d'étapes à franchir pour développer cliniquement le produit. Il reste spécialement à tester les éventuels effets secondaires dus à la colonisation délibérée de l'intestin par des bactéries génétiquement modifiés.

Selon le Dr Lisa Power, du Terrence Higgins Trust, cette recherche basée sur l'idée astucieuse d'utiliser les bactéries pour améliorer la résistance à la transmission, est prometteuse.

Cependant, selon elle, il y a un très long chemin à faire avant un emploi pratique chez les humains et dès lors les préservatifs restent la meilleure défense que nous ayons contre l'HIV et les autres infections sexuellement transmises.

#### **4.10 Remplacement de la teinture chimique**

##### **a) Objectif**

Une nouvelle variété de coton génétiquement modifiée a été créée : les gènes introduits produisent une coloration de la plante. Cela permet une réduction de l'utilisation de teinture chimique, très polluante pour l'environnement

#### **4.11 Utilisation de moins de pesticides**

##### **a) Objectif**

Quelques plantes génétiquement modifiées, les PGM, sont capables de synthétiser elles-mêmes un insecticide. Il n'y aurait alors plus besoin de pulvériser les champs, et donc le sol, avec des insecticides. Ceci permettrait une baisse de la pollution dans les régions agricoles.

Pour revenir à l'exemple du maïs résistant à la Pyrale, il faut savoir que les PGM sont plus efficaces dans la lutte contre les insectes ravageurs que les insecticides chimiques car celui synthétisé par la plante est présent en permanence. Ainsi, les insectes cibles sont touchés à la moindre ingestion, alors qu'avec un insecticide classique, l'efficacité diminue avec le temps après la pulvérisation, et toutes les parties de la plante ne sont pas touchées.

D'autres PGM peuvent également être résistantes à des herbicides totaux. Il suffit alors de le pulvériser dans le champ : toutes les plantes présentes meurent, sauf la plante transgénique.

Un seul herbicide est donc nécessaire.

Ainsi, aux Etats-Unis, ces PGM ont permis de diviser par cinq l'utilisation d'insecticides sur huit cent mille hectares de plantation de coton transgénique (photo) résistant à différents insectes

##### **Commentaires sur cet objectif**

Les scientifiques ne savent que peu de choses sur les effets de l'introduction d'un gène étranger dans le développement d'un organisme, l'organisation de son génome ou dans la spéciation.

Dans le doute, l'Afssa (Association française de sécurité sanitaire des aliments) a revu récemment les modes d'évaluation d'aliments issus d'Ogm, considérant que l'expression d'un gène dans un environnement génétique totalement nouveau peut avoir des effets inattendus.

On sait également que l'introduction de nouvelles espèces dans un environnement donné peut avoir un impact important, parfois irréversible. Quels peuvent être les avantages sélectifs de nouvelles propriétés comme la résistance à des insectes ou à des herbicides ? En l'absence de connaissances suffisantes sur le sujet, le principe de précaution impose de poursuivre les évaluations des variétés cultivées sous le contrôle d'instances indépendantes.

Les plantes génétiquement modifiées pour s'auto protéger contre un insecte, par exemple, pourraient susciter l'apparition d'insectes résistants à ces plantes transgéniques, à la suite d'une mutation génétique « naturelle » chez ces derniers.

Le bacille Thuringiensis [bT] est une bactérie à tiges génératrices de spores. Or, dans certains pays (Malaisie, Japon, Hawaï), son application répétée, sous forme de pesticide, a entraîné la sélection de populations d'insectes ravageurs capables de résister à l'action de ce produit.

Aucune preuve expérimentale n'a permis d'éliminer les risques potentiels des molécules insecticides fabriquées par les plantes transgéniques. Ces substances peuvent être toxiques pour le foie, les reins, le cerveau. De même les aliments fabriqués à partir des végétaux qui tolèrent les herbicides peuvent devenir toxiques en raison de leur forte teneur en poisons. Ces derniers peuvent aussi se retrouver dans toute la chaîne alimentaire (lait, viande) jusqu'à des doses maximales autorisées.

#### **4.12 Dépollution**

##### **a) Objectif**

Dans le domaine environnemental, on pourra envisager à l'avenir d'utiliser des plantes ou des micro-organismes permettant de dépolluer les sols contaminés et plus généralement d'éliminer les contaminants de l'environnement. Des plantes pourront ainsi être utilisées comme pièges à nitrates pour dépolluer les sols. Ces applications sont encore au stade de la recherche

##### **b) Commentaires sur cet objectif**

Il existe un microorganisme qui dévore les déchets nucléaires -découvert dans les années 50, redécouvert en 1998 et reconnu aujourd'hui pour ses capacités. Le nom scientifique de ce microorganisme qui dévore les déchets nucléaires est *Deinococcus Radiodurans* qui signifie "baie étrange qui résiste aux radiations". Le *Deinococcus* peut oxyder le toluène et le dévorer. Michael Daly et son équipe pensent rendre la bactérie capable d'avalier et d'oxyder le toluène radioactif et le trichloréthylène radioactif.

Est-il utile de créer des OGM pour faire ce que des plantes ou micro-organismes naturels peuvent faire ?

#### **4.13 Des plantes ou animaux produisant des médicaments**

## **a) Objectif**

Dans le domaine médical, la production d'hormones de croissance à partir de bactéries génétiquement modifiées contenant le gène de l'hormone de croissance humaine a permis depuis le début des années 1980, de traiter de nombreux cas de nanisme. Les microorganismes génétiquement modifiés sont également utilisés pour la production d'insuline ou de vaccins anti-hépatite B. La thérapie génique a d'ores et déjà été expérimentée pour des pathologies très diverses, du cancer aux maladies cardiovasculaires, de la myopathie à la mucoviscidose. A l'avenir, le génie génétique pourra, par exemple, permettre de lutter contre certaines maladies et de mettre en œuvre de nouveaux procédés d'obtention de produits thérapeutiques tels que des anticorps permettant de traiter des cancers.

Depuis les années 1970, les scientifiques savent modifier des micro-organismes en vue de la synthèse de molécules. Grâce à des micro-organismes conçus sur mesure, il est possible de produire de l'insuline ou des hormones de croissance, jusque-là extraites de pancréas de porc ou d'hypophyse humaine (chez des cadavres).

D'autre part, des études sont en cours sur des plants de tabac qui pourraient synthétiser de la lipase, une enzyme permettant de combattre la mucoviscidose.

Ainsi, le recours aux médicaments biologiques présente deux avantages :

Premièrement, sur le plan économique, la fabrication de médicaments par les « usines biologiques » coûte moins cher que les méthodes « traditionnelles ». Ensuite, sur le plan médical, le traitement par des médicaments provenant de plantes génétiquement modifiées supprime les risques de transmission d'agents pathogènes des tissus humains ou animaux. En effet, les virus des plantes ne sont pas transmissibles à l'homme ou tout du moins n'ont aucun effet sur son organisme.

### **Commentaires sur cet objectif**

Certaines maladies auto-immunes sont secondaires à l'apparition de complexes immuns circulants formés de substances étrangères fixant des anticorps spécifiques développés contre ces substances extérieures. Les nouveaux aliments OGM, leurs virus, ne peuvent-ils pas passer la barrière digestive et ne peuvent-ils pas créer des phénomènes identiques? S'il n'en est pas ainsi pour les aliments habituels que l'Homme a connus peu à peu dans son évolution millénaire, c'est parce que nous avons appris à créer des enzymes adaptées à les disséquer dans notre tube digestif avec l'aide du pancréas notamment. Ces enzymes ont été acquises peu à peu, au cours de l'évolution, et notre corps sait les fabriquer, au jour le jour, en fonction des aliments ingérés. Encore faut-il que l'organisme ait eu un jour connaissance de ces aliments. Il est donc fort probable que le corps mette un certain temps avant d'apprendre à dégrader les brins d'ADN manipulés. Ce qui renforce conséquemment les risques de pénétration digestive, d'allergies et de maladies auto-immunes.

Le facteur de croissance synthétisé par génie génétique dans la bactérie *E. coli* est produit avec un taux d'erreur de mutations de 20% lors de la transcription de l'ADN à l'ARN. De nombreuses erreurs concernent même les valeurs d'acides aminés. En clair, l'hormone de

croissance synthétique est différente de sa version humaine, bref cette technologie est "hasardeuse, non fiable et n'est pas sous contrôle"

Les chercheurs intègrent souvent un gène de résistance à un antibiotique en même temps que le transgène à la cellule qu'ils veulent modifier.

Le développement de la résistance aux antibiotiques doit être envisagé comme une fatalité. En effet, si la recrudescence de micro-organismes pathogènes due au développement de résistances aux antibiotiques est réelle, nous pouvons espérer une parade grâce aux progrès incessants de la biologie moléculaire, qui ne se contentera bientôt plus de produire en masse des substances antibiotiques naturelles, mais qui sera capable d'inventer de nouvelles molécules entièrement synthétiques. A l'exemple de la bataille à laquelle se sont livrées les espèces au cours de l'évolution, nous ne pouvons pas rester sur des acquis mais devons toujours développer de nouvelles stratégies pour contrer celles de l'adversaire.

Lors de l'insertion d'un gène étranger (transgénèse) on ne sait pas très bien où va se localiser le transgène dans le génome. Il est usuel d'utiliser un plasmide comme vecteur de transgénèse de plante via une bactérie. Or on a pu constater que l'insertion d'un plasmide "quelque part dans une bactérie" a conduit à une augmentation de la virulence de ladite bactérie.

### **5. La barrière des espèces peut-elle être franchie ?**

Officiellement, la solution des plantes transgéniques pour produire des médicaments est considérée comme une voie d'avenir sûre, en termes de risques de contamination. En effet, il n'y a pas de maladies transmissibles entre l'homme et la plante, ce qui n'est pas le cas entre l'homme et l'animal. Ainsi, l'équivalent de la lipase gastrique du chien, utilisée dans la lutte contre la mucoviscidose, a été produit expérimentalement par des colzas et des maïs transgéniques.

Une étude réalisée pendant trois ans par le professeur Hans-Heinrich Kaatz, de l'université de Iena, a mis en évidence que le gène utilisé pour modifier la structure génétique du colza, dont on extrait de l'huile, s'était propagé à des bactéries portées dans leur organisme par des abeilles. Cette découverte va à l'encontre des théories de l'industrie de la biotechnologie et des partisans des OGM sur la transmission des gènes entre espèces. Elle devrait aussi accroître la pression pour la destruction en Europe de champs de colza contaminés par des semences génétiquement modifiées.

### **6. Le « miracle transgénique »**

"Au début, Gottfried Gloeckner a cru au miracle transgénique dont il a semé des plants pour nourrir ses vaches. Lorsque, quatre ans plus tard, cinq vaches sont mortes subitement, puis sept autres, le paysan a ordonné des expertises et a alerté les autorités. Sans succès. A peine l'Union Européenne avait-elle autorisé en 1997 le maïs génétiquement modifié BT 176 sur une surface limitée, que le paysan de Heese (centre-ouest) en semait sur son exploitation. (...) Les champs de maïs étaient réguliers, le grain rond", se souvient Gottfried qui a progressivement mélangé une quantité croissante de ce maïs à la nourriture de ses vaches. Jusqu'à ce qu'au printemps 2001, il observe "des troubles" chez cinq de sa soixantaine de

vaches : du sang dans le lait et dans l'urine, des diarrhées, puis la mort, sans qu'aucun vétérinaire ne puisse poser de diagnostic. L'année suivante, le phénomène se reproduisait avec sept vaches. Le BT 176 contient un gène modifié destiné à repousser les insectes. Mais selon la fiche informative du fournisseur de Gottfried, Syngenta GmbH, "il est officiellement prouvé qu'il ne provoque ni empoisonnement, ni allergie, qu'il est éliminé en quelques secondes par l'appareil digestif et n'est présent ni dans le lait, ni dans la viande". Le paysan a ordonné plusieurs expertises, qui ont établi que "la substance reste beaucoup plus longtemps que prévu dans l'organisme". "Sur des vaches en pleine forme, cela n'a peut-être pas d'influence, mais dès qu'elles sont affaiblies, cela peut être mortel", estime l'agriculteur. Gottfried a fourni le résultat des expertises au ministère régional de l'Agriculture de Hesse et au Robert Koch Institu (RKI) à Berlin, chargé de la surveillance de la santé publique et notamment de l'appréciation du danger des OGM. L'expert Hans-Joerg Buhk assure que "le maïs BT 176 est étudié depuis longtemps et passe pour être sûr. Les experts n'ont pas pu vérifier son argumentation". Ils n'ont pas non plus trouvé la cause de la mort des bêtes.

L'expérience a démontré que les facteurs essentiels pour la vie sauvage sont plutôt le type d'herbicides que les agriculteurs utilisent et le moment où ils les utilisent, et non pas le fait que la culture soit génétiquement modifiée ou non. Les résultats ont été extrêmement constants, peu importe le lieu ou l'année de culture au Royaume-Uni, selon Les Firbank, coordinateur de l'expérience du Center for Ecology and Hydrology (Centre d'Ecologie et d'Hydrologie) de Merlewood, Cumbria.

L'important, ce sont les énormes différences d'impacts que les cultures (traditionnelles ou génétiquement modifiées) ont eu sur la vie sauvage. Dans de nombreux cas, ces différences ont éclipsé celles entre la culture génétiquement modifiée et sa variété traditionnelle. Par exemple, les chercheurs ont recueilli une moyenne de 1707 coléoptères sur une année dans les champs de culture traditionnelle, légèrement supérieure aux 1576 trouvés dans les champs de betteraves génétiquement modifiées. Mais ils en ont trouvé plus du double dans le cas du maïs et 50 à 60% de plus dans les graines. Le maïs, dont la variété modifiée était meilleure pour la vie sauvage que la variété traditionnelle, s'est avéré être la pire sur de nombreux points

## **7. La crainte des OGM**

C'est celle de l'inconnu, de la manipulation des gènes: juste un menu fragment d'ADN ajouté, mais pas toujours au bon endroit car la construction d'un OGM demeure souvent approximative, pourrait conduire à une catastrophe. On ne peut savoir à l'avance si l'emplacement et la fixation du transgène seront une réussite; si ce gène introduit ne «réveillera» pas ses voisins ou au contraire n'en bloquera pas d'autres.

Au demeurant, même si l'opération est parfaitement maîtrisée, on n'est pas sûr que ce gène nouveau ne subisse pas de mutations à force de croisements répétés de la plante ou de l'animal concernés. Ces craintes grandissent encore quand l'OGM est cultivé en plein champ, il peut se produire par hybridation une contamination d'espèces naturelles qui deviennent ainsi par exemple tolérantes aux herbicides. Le risque peut encore s'amplifier quand une plante manipulée devient toxique et que des molécules dangereuses pour la santé ou

allergisantes se concentrent en bout de chaîne alimentaire ou même dans le sol, en effet les vers de terre sembleraient pouvoir être intoxiqués par un sol où on a planté des OGM.