

LA TRANSGENESE VEGETALE : TECHNIQUES ET RESULTATS

Alain DESHAYES

Centre de Recherche Nestlé-Tours
101, avenue Gustave Eiffel
37390 NOTRE DAME D'OE

1 - INTRODUCTION

Les premières plantes transgéniques ont été obtenues quasi simultanément par trois équipes en 1983. Ainsi, presque 10 ans s'étaient écoulés depuis la découverte du plasmide Ti comme facteur responsable de la maladie dite de la galle du collet. Ce grand plasmide est porté par la bactérie du sol *Agrobacterium tumefaciens*, connue depuis longtemps pour son caractère pathogène.

La période qui a suivi ces premiers succès du génie génétique chez les végétaux peut se caractériser par un certain nombre de points forts :

- tout d'abord, une intense activité scientifique s'est développée grâce au génie génétique qui a permis des approches entièrement nouvelles pour des études sur le mode de fonctionnement du vivant, la biologie du développement ou les interactions plantes / micro-organismes ;

- la puissance de l'outil est apparue très rapidement à nombre de scientifiques qui, relayés efficacement par tous les médias, ont annoncé que le génie génétique allait révolutionner les travaux d'amélioration des plantes. Le fait de pouvoir construire à volonté les plantes ayant les caractéristiques désirées allait résoudre de nombreux problèmes agronomiques, répondre aux exigences de la protection de l'environnement et fournir à l'industrie agro-alimentaire des plantes mieux adaptées à ses exigences. On a pu aussi lire et entendre des propos enflammés sur "la" solution enfin à portée de main pour résoudre le problème de la faim dans le monde ;

- sur la foi de toutes ces annonces de résultats extraordinaires, des financiers ont investi des sommes considérables pour être prêts à contrôler le marché de ces futures semences améliorées. Cette période a ainsi été celle de la création, principalement aux Etats-Unis, d'un nombre important de Sociétés de Biotechnologies et, cela, le plus souvent par des scientifiques venus de l'université ;

- de nombreux groupes multinationaux, de l'agrochimie, de la pharmacie, du pétrole, voir du ciment, attirés par les perspectives de rémunérations importantes, sont entrés dans le domaine des semences. D'autres ont choisi une stratégie différente et se sont engagés dans des projets de génie génétique en espérant, par la maîtrise de la technologie, fournir aux semenciers les plantes dont ils auraient besoin. Mais, depuis, les "sorties" ont été nombreuses !

- sous la pression des Sociétés de Biotechnologie, des industriels et des financiers ayant investi dans les technologies de l'ADN recombinant, les règles de protection juridique concernant le "vivant" ont été déstabilisées.

Or, force est de constater qu'à ce jour les résultats qui ont conduit à des produits mis sur le marché sont encore peu nombreux. Il ne faut pourtant pas voir dans cette situation un échec de la technologie. En effet, les projets en cours dans les laboratoires laissent au contraire penser que l'on va bientôt entrer dans une période féconde pour la commercialisation de plantes génétiquement modifiées pour des caractères d'intérêt. Tout au plus peut-on dire que la rapidité d'obtention des résultats a été notablement surestimée et, qu'aujourd'hui, l'intérêt du génie génétique a été ramené à une position plus raisonnable au regard des autres moyens dont disposent les sélectionneurs pour améliorer les plantes cultivées.

L'objet de cet exposé est donc de faire un point rapide sur les diverses techniques de transgénèse végétale, de donner un aperçu des résultats actuels et de proposer quelques réflexions sur l'intérêt potentiel du génie génétique pour les industries de l'agro-alimentaire.

2 - LES TECHNIQUES DE TRANSGENESE VEGETALE

***Agrobacterium* : vecteur naturel pour la transformation génétique.**

La démonstration, en 1974, que le plasmide Ti de la bactérie du sol *Agrobacterium tumefaciens* était à l'origine du pouvoir pathogène, ouvrait une ère nouvelle dans la biologie végétale. La découverte ultérieure que la bactérie avait la capacité de transférer une partie constante de l'ADN de son plasmide, appelé pour cette raison ADN-T, dans les chromosomes de la cellule végétale, permit en effet d'accéder à une méthode simple et naturelle de transformation génétique. Les gènes portés par l'ADN-T, dont l'activité était responsable de la pathogénicité liée à l'infection bactérienne, ont été délétés en préservant les régions bordures de cet ADN-T. Ces bordures se sont en effet révélées nécessaires et suffisantes pour permettre le transfert, dans les chromosomes de la cellule, de toute séquence d'ADN, donc de tout gène d'intérêt, comprises entre elles. Le plasmide Ti est un grand plasmide, donc difficile à manipuler. De nouveaux plasmides ont donc été construits, ils sont de petite taille et ne contiennent que les informations strictement nécessaires pour permettre le transfert des gènes d'intérêt dans la cellule végétale. Ils peuvent, de plus, être utilisés aussi bien dans *Agrobacterium* que dans *E. coli*, ce qui représente un avantage significatif pour toutes les opérations d'insertion des gènes d'intérêt. Une autre bactérie pathogène du sol, *Agrobacterium rhizogenes*, qui provoque la maladie dite du chevelu racinaire, présente des propriétés similaires à celles d'*Agrobacterium tumefaciens*, a fait également l'objet de travaux importants.

Le système *Agrobacterium* présente de nombreux avantages, il est aujourd'hui relativement facile d'utilisation et il permet l'insertion d'un fragment précis d'ADN. Toutefois, toutes les espèces et, à l'intérieur d'une espèce, toutes les variétés, ne répondent pas d'une manière aussi efficace à l'infection par *Agrobacterium*. Cette situation, perçue dès le début des années 80, a conduit les scientifiques à rechercher des méthodes alternatives de transformation génétique.

Les méthodes de transfert direct

Alors que la transformation génétique par *Agrobacterium tumefaciens* n'était pas encore acquise, des méthodes alternatives, dites de transfert direct, étaient déjà à l'étude dans les laboratoires. Ces méthodes consistent à utiliser des moyens physiques ou chimiques pour forcer la pénétration d'un fragment d'ADN dans une cellule végétale. L'expérience a montré que non seulement on pouvait obtenir cette pénétration par différents procédés, mais que l'intégration stable de fragments d'ADN dans les chromosomes pouvait également être obtenue. Aujourd'hui, 12 méthodes de transfert direct ont été décrites (Tableau 1) :

Polyéthylèneglycole (PEG) : Ce polycation mis en contact avec des protoplastes modifie les propriétés de la membrane plasmique qui est ainsi rendue perméable à l'entrée de macromolécules, d'ADN en particulier, dans la cellule. Cette méthode, bien que simple et relativement efficace, n'est plus guère utilisée.

Liposomes : Constitués de monocouches de phospholipides, des liposomes encapsulant des fragments d'ADN peuvent être fusionnés, en présence de PEG, avec des protoplastes. Cette opération permet ainsi la libération des fragments d'ADN dans la cellule, lesquels peuvent ensuite s'intégrer dans les chromosomes. Les faibles rendements en événements intégratifs ont très vite condamnés cette méthode.

Sphéroplastes bactériens : La fusion de sphéroplastes bactériens, contenant un plasmide porteur des gènes d'intérêt, avec des protoplastes, toujours en présence de PEG, a également permis l'obtention d'événements intégratifs. Utilisée en routine pour la transformation de cellule animale, cette méthode n'a guère été utilisée pour les cellules végétales, car, d'une part, les fréquences de transformants stables sont faibles mais, surtout, le nombre d'événements d'intégration par cellule s'est révélé trop important.

Electroporation de protoplastes : Cette méthode consiste à soumettre des protoplastes à un champ électrique pendant une fraction de seconde. Durant cette brève période, la membrane plasmique est perméabilisée, d'une manière réversible, permettant ainsi la pénétration de fragments d'ADN dans la cellule. L'utilisation conjointe du PEG peut augmenter les fréquences de transformants stables. Cette méthode présente de nombreux avantages, elle est très reproductible et les fréquences de transformants sont élevées. Toutefois, comme également les trois méthodes précédentes, elle suppose que la régénération de plantes à partir de protoplastes soit possible, ce qui en limite *de facto* son emploi chez les espèces récalcitrantes à la régénération.

Tableau 1. *Techniques de transformation génétique végétale*

AGROBACTERIUM	1983
PEG	1984
LIPOSOMES + PEG	1984
SPHEROPLASTES	1985
ELECTROPORATION (Protoplastes)	1986
MICROINJECTION - ADN	1986
- CHROMOSOMES	1987
MICROPROJECTILES	1988
MACROINJECTION	1988
ELECTROPORATION (Tissus)	1991
ELECTROPHORESE	1993
INFILTRATION <i>IN VIVO</i>	1993
FIBRES DE CARBURE DE SILICONE	1994

Microprojectiles : Des billes de tungstène, de 1 à 10 μm de diamètre et enrobées d'ADN, sont projetées à haute vitesse sur des cellules ou des tissus. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir être utilisée sur des tissus organisés, comme par exemple des embryons somatiques, elle donc intéressante pour de nombreuses espèces. Par contre, elle a l'inconvénient de produire un nombre important de plantes chimères et d'engendrer de nombreux inserts. Elle est cependant une des méthodes les plus utilisées en raison de sa facilité d'emploi et de son efficacité. De plus, cette méthode de microbombardement a récemment été utilisée en prétraitement à une infection par *Agrobacterium*.

Macroinjection : Certaines publications font état d'obtention de plantes transformées après injection d'une solution d'ADN dans le style de plantes de coton et de riz. Toutefois, ces résultats ont été contestés car ils n'ont pu être reproduits. Cette méthode reste donc un cas d'école.

Microinjection : A l'aide d'un micromanipulateur, une solution d'ADN microinjectée dans les noyaux permet l'obtention, à des fréquences faibles, de transformants stables. Utilisée en routine pour les cellules animales, cette méthode est extrêmement fastidieuse à mettre en oeuvre chez les cellules végétales. Elle n'est guère employée actuellement, bien que des résultats intéressants ont été obtenus chez le blé par microinjection de grains de pollen. Enfin, il faut mentionner la microinjection dans des cellules de Pétunia de chromosomes isolés ; mais un seul cas de succès a été rapporté.

Electroporation de tissus : Plusieurs cas ont été rapportés de plantes transgéniques obtenues à partir de tissus (graine de riz, embryons immatures de maïs et bourgeons axillaires de pois) ou de grains de pollen (orge) soumis à un champ électrique. Cependant son intérêt réel paraît limité.

Electrophorèse : Des plantes transgéniques ont été obtenues par le passage d'un courant électrique au travers d'embryons d'orchidées placés entre deux blocs d'agarose, dont un contenant de l'ADN, reliés à des électrodes. Cette méthode reste également d'un intérêt limité car elle suppose une manipulation individuelle des embryons.

Infiltration in vivo : De jeunes plantes d'*Arabidopsis*, au stade du premier bourgeon floral, ont été plongées dans une solution aqueuse contenant une souche d'*Agrobacterium*, à l'intérieur d'un cristalliseur soumis à un vide pendant quelques minutes. Les plantes ont été ensuite lavées et replantées en terre. Sur ces plantes, les graines ont été récoltées puis semées. Parce que la bactérie a pu pénétrer les tissus méristématiques lors de l'infiltration sous vide, certaines des plantes ainsi obtenues ont exprimé des mutations dues à des insertions de l'ADN-T du plasmide bactérien. Cette méthode, simple et rapide, s'est révélée d'une très grande efficacité au regard de la fréquence de mutations d'insertion. Elle présente également l'avantage de ne pas recourir à la culture *in vitro*, elle devrait donc être généralisée à d'autres espèces.

Fibres de carbure de silicone : Des embryons de maïs ont été agités vigoureusement pendant quelques secondes dans une solution contenant des microfibrilles de carbure de silicone ; celles-ci ont un diamètre de 0,6 µm et une longueur de 8 à 10 µm. Bien que la régénération des embryons ait été affectée, des plantes ont été obtenues. Cette méthode, également simple et rapide, pourrait être intéressante dans certains cas. Toutefois, les fibres de carbure de silicone pourraient présenter les mêmes risques que l'amiante, leur utilisation doit donc s'effectuer dans des conditions rigoureuses.

Il existe donc une panoplie de méthodes de transformation génétique des cellules végétales, chacune avec des avantages et des inconvénients variés. Toutes ne sont pas utilisées en routine dans les laboratoires, mais l'expérimentateur a le choix de la méthode qui permet de réaliser le meilleur compromis entre les contraintes liées au matériel végétal utilisé et celles inhérentes à la méthode proprement dite. D'une manière générale, une méthode de transfection doit être simple, efficace, reproductible et peu coûteuse.

3 - LES RESULTATS ACTUELS

Tableau 2. *Plantes transgéniques mises sur le marché ou en attente*

Comportement agronomique

Maïs	Tolérance à la phosphinotricine	Agrevo, Dekalb
	Tolérance au glyphosate	Agrevo
	Résistance à un lépidoptère	Ciba-Geigy, Monsanto
	Résistance à un virus	Pioneer
Colza	Tolérance à la phosphinotricine	Agrevo
	Tolérance au glyphosate	Monsanto
	Tolérance au bromoxynil	Rhône-Poulenc
	Sterilité mâle	PGS

Coton	Tolérance au glyphosate Tolérance aux oxynils Tolérance aux sulfonyleurées Résistance à un lépidoptère	Monsanto Calgene Du Pont de Nemours Monsanto
Pomme de terre	Résistance à un coléoptère Résistance à un champignon Résistance à un nématode	DNAP, Monsanto Mogene Mogene
Betterave	Tolérance au glyphosate Résistance à un virus Résistance à un champignon	Maribo Maribo Maribo
Tomate	Résistance à un champignon	Mogene
Soja	Tolérance au glyphosate	Agrevo, Monsanto
Courgette	Résistance à un virus	Asgrow
Cantaloup	Résistance à un virus	Asgrow
Luzerne	Résistance à un virus	Pioneer
Melon	Résistance à un virus	Limagrain
Tabac	Tolérance au bromoxynil	Seita
Pois	Tolérance au poursuit	Cynamid
Lin	Tolérance aux sulfonyleurées	Du Pont de Nemours
Qualité technologique		
Colza	Contenu en huiles	Calgene
Tomate	Teneur en matière sèche	Zeneca, Calgene
Pomme de terre	Teneur en amidon Teneur en sucres	Fritolay Monsanto
Qualité organoleptique et/ou nutritionnelle		
Colza	Teneur en phytates	Mogene
Tomate	Maturité du fruit	Calgene, DNAP, Monsanto, Zeneca
Soja	Contenu en huiles Contenu en protéines	Du Pont de Nemours Pioneer
Poivre	Flaveur	DNAP
Production de molécules à haute valeur ajoutée		
Colza	Protéines	PGS
Pomme de terre	Protéines	Mogene

Une soixantaine d'espèces sont aujourd'hui accessibles à la transformation génétique par au moins une des méthodes mentionnées précédemment. Certes, selon les espèces et, parfois même, selon les variétés, il peut être plus ou moins facile d'obtenir des plantes génétiquement modifiées. Mais il importe de souligner qu'aujourd'hui, le facteur limitant à l'obtention de plantes "intéressantes" n'est plus lié à la méthode elle-même, il dépend principalement de l'intérêt du gène introduit.

Les plantes transgéniques actuellement obtenues peuvent être classées en quatre catégories selon leur domaine d'intérêt potentiel (Tableau 2).

Comportement agronomique

Des plantes exprimant des gènes de résistance à des pathogènes, à des prédateurs ou encore à des herbicides intéressent en premier lieu les agriculteurs. Dans les pays développés, ces plantes devraient permettre de réduire l'emploi des pesticides et de diminuer les coûts de main d'oeuvre. Dans les pays en développement, où l'usage des pesticides est limité, voir inexistant, ces plantes devraient permettre d'améliorer d'une manière significative les rendements. Comme le montre le Tableau 2, les plantes génétiquement modifiées pour l'amélioration de leur comportement agronomique sont aujourd'hui les plus nombreuses.

Propriété technologique

Les industriels de l'agro-alimentaire devraient pouvoir bénéficier d'avantages spécifiques grâce à l'utilisation de plantes dont les propriétés nouvelles permettraient, soit de diminuer les quantités de matière première tout en produisant les mêmes quantités de produit fini, soit d'augmenter les rendements au cours des processus de transformation.

Qualité organoleptique

L'amélioration de la qualité organoleptique des produits frais comme des produits industriels est la seule modification génétique que le consommateur pourra percevoir. Or, vraisemblablement en raison de la complexité qu'il y a à définir les composantes de la qualité organoleptique, peu de résultats significatifs ont encore été obtenus.

Production de molécules

Les plantes constituent déjà une source importante de matière première pour certaines industries de la chimie, de la pharmacie ou de la cosmétique, mais il n'est pas déraisonnable de penser que cette importance devrait augmenter au cours des prochaines décennies. D'une part, il y a une tendance à la substitution de produits d'origine animale par des produits végétaux et, d'autre part, le faible coût des matières premières végétales pourrait devenir attractif comparativement à celui des produits dérivés des matières premières fossiles qui, par définition, sont en quantité finie. Par ailleurs, on observe actuellement un regain d'intérêt pour les cultures de cellules végétales en bioréacteur, soit pour la production de biomasse, soit pour la production de molécules à haute valeur ajoutée. Dans cette perspective, le génie génétique peut apporter des solutions élégantes comme l'attestent déjà certains résultats.

Ainsi, malgré le fait que le génie génétique n'a pas apporté les révolutions annoncées un peu trop rapidement par certains, la puissance de l'outil n'en a pas moins été confirmée. Les résultats actuels, ceux qui font d'ores et déjà l'objet d'un développement industriel, comme ceux qui sont encore au stade du laboratoire, montrent à l'évidence que l'utilisation du génie génétique peut apporter des solutions intéressantes et originales. Comme cela a déjà été indiqué, le facteur limitant à l'emploi du génie génétique dans une perspective industrielle n'est plus d'ordre technologique, mais est lié à l'accès aux "gènes d'intérêt". Autrement dit, c'est notre manque de connaissance des phénomènes biologiques qui limite l'identification des "cibles" les plus pertinentes. Nous ne savons, en effet, que peu de choses sur les déterminants génétiques du rendement, de la résistance aux maladies, de la résistance aux stress de l'environnement ou de la "qualité" des produits récoltés. Mais, grâce aux outils modernes de la biologie, on peut avoir la certitude que des progrès significatifs seront réalisés dans les prochaines années et que ceux-ci permettront d'atteindre des objectifs vraisemblablement insoupçonnés aujourd'hui.

4 - CONCLUSION

En guise de conclusion, je voudrais apporter quelques réflexions concernant les aspects "génie génétique et consommation", "génie génétique et industrie agro-alimentaire" et "génie génétique et développement".

J'ai évoqué, au cours de cet exposé, le fait que la rapidité de l'impact agronomique et industriel des plantes transgéniques avait été très largement mal évaluée et surtout surestimée, tant par les scientifiques que par les industriels. Mais il y a un domaine qui n'a pas été suffisamment anticipé, c'est celui de la réaction des consommateurs. Outre des oppositions d'ordre éthique liées à l'intervention de l'homme sur le patrimoine génétique, des mouvements d'opinion se sont en effet développés pour exprimer un refus de consommer des produits issus du génie génétique. Pour irrationnelles que soient certaines de ces réactions, elles n'en constituent pas moins une réalité. Dans nos sociétés judéo-chrétiennes, la nourriture a un rapport très étroit avec le sacré, ce qui n'est pas le cas dans d'autres sociétés, asiatiques par exemple. Aussi, je m'interroge souvent sur ce qu'auraient pu être les réactions de l'opinion si l'accent avait davantage été mis sur les applications non alimentaires des plantes transgéniques. Certes, cela n'aurait sûrement pas modifié la nature des débats sur les risques potentiels pour l'environnement, mais les oppositions auraient-elles été aussi fortes si les premières plantes transgéniques proposées à la commercialisation avaient concerné des applications non alimentaires : fibres (coton), huiles (colza) ou amidons (maïs) ? Cette question est aujourd'hui académique, mais ce défaut initial d'évaluation des réactions de l'opinion n'a-t-il pas retardé les premières applications et conduit à la mise en oeuvre d'analyses lourdes autant qu'inutiles, destinées à "montrer" à l'opinion que la consommation de plantes transgéniques ne présentaient pas de risque ?

Si, par ailleurs, on regarde du côté des industries de l'agro-alimentaire, force est de constater que celles-ci n'apparaissent pas sur le front du génie génétique. Il est évident que les mouvements d'opinion contre le principe même de son utilisation n'ont pas été de nature à favoriser des investissements de recherche, alors qu'il y avait un risque que des produits mis sur le marché ne soient pas achetés. Mais, au-delà de cette attitude de prudence et, même, de bon sens, on ne peut éviter de se poser une question de base : le génie génétique doit-il s'imposer à l'industrie agro-alimentaire comme une technologie incontournable ? Ce qu'attend le consommateur d'un produit qu'il achète dans un supermarché, c'est la sécurité alimentaire, un coût faible et le plaisir qu'il aura à le consommer ; mais les technologies qui ont été utilisées pour sa fabrication constituent, d'une manière générale, un élément de choix très marginal. Par contre, pour l'industriel, le choix des technologies peut avoir une influence décisive sur l'un, ou plusieurs, des critères de sécurité, de prix et de qualité ; cela, non seulement pour satisfaire le consommateur, mais aussi pour résister à la concurrence. Toutefois, l'industrie agro-alimentaire ne peut pour autant se désintéresser des aspects agronomiques dans la mesure où, par exemple, un pathogène ou un ravageur pourrait risquer de mettre en péril l'approvisionnement des usines en matière première. Ainsi, on voit qu'il n'y a pas de réponse univoque à la question posée et on ne peut pas dire que le génie génétique doit s'imposer, comme le micro-ordinateur s'est substitué à la machine à écrire, ou que l'avion s'est substitué au bateau pour se rendre d'un point à l'autre de la planète. Ceci étant, et comme je l'ai indiqué au cours de cet exposé, nous ne sommes qu'à l'aube des applications du génie génétique chez les végétaux et ce serait une erreur profonde que de s'en désintéresser, ce que n'ont d'ailleurs pas fait les grandes sociétés de l'agro-alimentaire. Aussi, la question est

davantage de savoir quand le génie génétique constituera-t-il pour elles un avantage compétitif significatif, que de s'interroger sur son intérêt qui, vraisemblablement, ne sera que ponctuel. De ce point de vue, il apparaît clairement que les approches des sociétés de biotechnologies et des sociétés de semences diffèrent de celles de l'agro-alimentaire. Les premières cherchent à rentabiliser leurs investissements en recherche, et donc à mettre leurs variétés transgéniques le plus rapidement possible sur le marché, alors que les secondes s'interrogent encore sur les avantages qu'elles pourront tirer de cette matière première génétiquement modifiée.

Enfin, je ne peux m'empêcher de conclure sur un point que j'évoquais dans mon introduction, à savoir l'importance potentielle du génie génétique pour les pays en développement. Je pense avoir une attitude clairement positive à l'égard du génie génétique et des résultats que l'on peut en attendre, tant d'un point de vue scientifique qu'agronomique ou industriel. Mais je suis parfois effaré, au cours de mes voyages, de constater à quel point le concept de "biotechnologies" peut avoir des effets pervers. Aucune technologie, si puissante soit-elle, ne peut répondre à des espérances de développement. Dans un contexte approprié et dans un ensemble de solutions, elle peut, certes, constituer un élément positif mais, en aucun cas, elle ne peut apparaître comme un élément moteur. Certains devraient prendre garde qu'à vouloir trop mettre en avant la technologie il y a un risque de tuer la technologie, si les résultats annoncés ne sont pas au bout de la route. Et, s'agissant des plantes transgéniques, il ne faut de plus jamais oublier que la sanction se fera tout autant au champ, à l'usine que sur le marché.

Journée de l'A.S.F. du 1^{er} février 1996