

---

# FICHE NOUVELLES TECHNIQUES

## TRANSGENÈSE VÉGÉTALE

---

### Présentation générale de la technique (Grand public)

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.

3 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.

### 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* :

Cette bactérie pathogène à l'état sauvage cause, chez les plantes infectées, la formation de tumeurs principalement au niveau du collet (zone de transition entre le système racinaire et la tige feuillée). Cette maladie appelée galle du collet ou « crown-gall » résulte du transfert d'une partie d'un ADN plasmidique de la bactérie (ADN-T) dans le génome de la plante. C'est l'expression des gènes de virulence (*vir*) dans les agrobactéries qui permet le transfert de l'ADN-T dans les cellules végétales.

*Agrobacterium tumefaciens* réalise donc, naturellement, la transgénèse d'une partie de ses gènes dans l'organisme végétal. Une fois ce mécanisme connu, il a été utilisé en biotechnologies dans le but de transformer génétiquement des végétaux. Pour cela, il faut modifier le plasmide Ti (en construisant un plasmide "désarmé") afin qu'il n'y ait pas de formation de galle du collet (délétion des gènes responsables du pouvoir pathogène de la bactérie), mais qu'il y ait quand même transfert et intégration de gènes d'intérêt dans le génome des plantes. Il suffit pour cela de garder intactes les deux frontières gauche et droite de l'ADN-T, ainsi que les fonctions de virulence. Le(s) gène(s) à transférer sera (ont) alors inséré(s) entre ces deux frontières et la bactérie portant cette construction pourra transférer le(s) transgène(s) dans les cellules végétales et contribuer à leur insertion dans les chromosomes des cellules végétales.

- Enfin, **la troisième étape** est la régénération : une fois l'ADN recombinant introduit dans la cellule végétale, quel que soit le vecteur utilisé, il faut régénérer la cellule modifiée en plante entière (notamment à l'aide d'hormones végétales seules ou en combinaison que l'on incorpore au milieu de culture *in vitro*) et s'assurer que le ou les gènes transférés ont été intégrés de façon stable dans le patrimoine génétique. La transformation d'*Arabidopsis thaliana* réalisée *in planta* par trempage floral permet cependant de s'affranchir des techniques de culture *in vitro*.

## Modalités de mise en œuvre

Le vecteur le plus couramment utilisé pour la transgénèse végétale est le vecteur bactérien *Agrobacterium tumefaciens* désarmé.

D'autres méthodes sont utilisées pour transférer l'ADN dans la cellule végétale, par exemple :

- la méthode directe de biolistique, nécessitant des billes de tungstène ou d'or sur lesquelles l'ADN a été adsorbé au préalable,
- l'introduction d'ADN dans des protoplastes (cellule végétale sans paroi pectocellulosique) nécessitant l'action d'un agent chimique (par exemple le PolyEthylene Glycol (PEG), polymère qui déstabilise de façon réversible les membranes plasmiques, permettant ainsi le transfert de l'ADN au travers de la membrane) ou d'un champ électrique (électroporation).

## Utilisations possibles

La transgénèse végétale trouve des applications dans différents domaines comme, la recherche, l'agriculture, la santé, l'environnement, ou encore dans l'industrie. Elle permet de générer, par exemple, des plantes :

- résistantes à certains insectes ou à certaines maladies,
- résistantes au brunissement enzymatique,
- tolérantes à des herbicides,
- tolérantes à un stress abiotique (comme la sécheresse, ou la réduction des apports hydriques),
- exprimant une protéine à usage thérapeutique,
- présentant un changement de composition nutritionnelle (par exemple, modifier la teneur en huile ou la composition en acides gras de certaines plantes),
- utiles à la remédiation des sols,
- permettant la production de plastiques biodégradables...

## Avantages et contraintes par rapport aux techniques existantes

Par rapport aux méthodes d'amélioration végétale classique, la transgénèse permet l'introduction dans une plante réceptrice d'un gène provenant de tout organisme donneur, il peut même s'agir d'un gène "artificiel" (synthétique).

Un des avantages, par rapport aux méthodes plus traditionnelles faisant appel aux rétrocroisements entre espèces et que dans le cas de la transgénèse, seul le transgène est transféré dans l'espèce réceptrice.

Des méthodes de plus en plus précises et fiables, applicables pratiquement à toutes les espèces cultivées (plantes ornementales, arbres, céréales, légumes, plantes tropicales, plantes médicinales...) ont été développées pour modifier les plantes. Cependant, les méthodes décrites dans cette fiche ne permettent pas de cibler le site génomique d'intégration du transgène.

## Détection

Les cibles de détection des OGM peuvent être soit les séquences d'ADN transgéniques insérées dans le génome, soit les ARNs transcrits à partir de ces séquences, soit les nouveaux métabolites produits (protéiques ou non protéiques). Les métabolites non protéiques peuvent être détectés par des méthodes d'analyses biochimiques spécifiques (ex : acide laurique chez le colza, b-carotène chez le riz, ...). Les protéines recombinantes peuvent être détectées par des tests enzymatiques (dégradation d'herbicides par exemple) ou des tests immunologiques (ELISA ou strip tests). Les séquences d'acides nucléiques transgéniques peuvent être détectées par PCR qualitative, PCR quantitative en temps réel, Southern et Northern blots, hybridation sur des puces à ADN et séquençage de première, seconde (NGS : Next Generation Sequencing) et troisième génération. Des approches de multiplexage sont possibles pour la détection simultanée de plusieurs cibles avec les différentes techniques de PCR et de séquençage (ex : ligation-mediated PCR (Holck et al., 2009)).

Afin d'optimiser les étapes de screening, des systèmes de détection par PCR utilisant des *pre-spotted plates* (PSP) ont également été développés en association avec des systèmes d'aide à la décision comme par exemple, celui développé récemment par le JRC pour détecter tous les OGM autorisés en Europe en une seule PCR (Rosa et al., 2016), ou, un autre combinant données de traçabilité et analyses et permettant d'optimiser la réalisation de ces dernières (Bohanec et al., 2017).

Au contraire des autres méthodes, la détection des séquences d'ADN transgéniques n'est pas affectée par le niveau d'expression des transgènes qui peut varier en fonction des tissus ou organes considérés, du stade de développement de la plante, du fond génétique ou de l'environnement.

La détection d'OGM non-autorisés repose sur des approches de screening et nécessite de prouver que les éléments génétiques détectés ne proviennent ni d'OGM autorisés, ni de sources non OGM (virus et microorganismes du sol, ...), ce qui peut parfois être assez compliqué. La facilité de leur identification dépend du niveau de connaissance disponible sur les séquences des transgènes présents. Elle est facilitée si des informations sont disponibles (par exemples, dans le cas d'un évènement évalué mais non autorisé en Europe, ou pour un évènement non-autorisé en Europe qui contiendrait une construction génétique proche d'un autre évènement autorisé produit par le même obtenteur). Dans le cas de plantes entières, les raisons pour lesquelles l'échantillon est soupçonné de contenir un OGM (phénotype, résistances impliquant certains types de gènes) sont également des indications permettant d'orienter l'identification. A l'inverse, si peu d'informations sont accessibles, l'identification peut nécessiter de laborieuses étapes de clonage et de séquençage, ce qui n'est pas actuellement envisageable en routine mais seulement dans des cas exceptionnels (litiges, ...).

La détection d'OGM inconnus pour lesquels aucune information n'est disponible, que ce soit au niveau de la séquence ou de la protéine recombinante produite, repose également sur du screening, mais celui-ci ne permet pas de détecter des OGM ne contenant que des éléments génétiques non encore décrits dans les bases de données des laboratoires d'analyses.

Les approches basées sur une comparaison à l'aveugle de données -omiques (séquençage de génomes complets, données transcriptomiques et protéomiques) entre l'échantillon incriminé et son équivalent non OGM supposé font l'objet de nombreuses études (Holst-Jensen et al., 2016) mais semblent encore difficiles à envisager pour des applications en routine chez les plantes. Les développements technologiques permettent en effet une réduction progressive des coûts et du temps de production de ces types de données mais ne lèvent pas les difficultés liées au temps et aux compétences requises pour leur analyse bioinformatique, ainsi que celles liées à l'existence de génomes de référence ou à la variabilité induite chez les plantes par l'environnement et la physiologie sur les niveaux d'expression.

## Bibliographie

Ahmad, P., Ashraf, M., Younis, M., Hu, X., Kumar, A., Akram N.A., Al-Qurainy F. (2012). Role of transgenic plants in agriculture and biopharming, *Biotechnology Advances*, 30 (3), 524-540.

Bohanec, M., Boshkoska, B.M., Prins, T.W., and Kok, E.J. (2017). SIGMO: A decision support System for Identification of genetically modified food or feed products. *Food Control* 71, 168–177.

Holck, A.L., Drømtorp, S.M., and Heir, E. (2009). Quantitative, multiplex ligation-dependent probe amplification for the determination of eight genetically modified maize events. *Eur. Food Res. Technol.* 230, 185–194.

Rosa, S.F., Gatto, F., Angers-Loustau, A., Petrillo, M., Kreysa, J., and Querci, M. (2016). Development and applicability of a ready-to-use PCR system for GMO screening. *Food Chem.* 201, 110–119.

Rivera, A.L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., Loske, A.M. (2012). Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews.* 9, (3), 308-345.

Ziemienowicz, A. (2014). Agrobacterium-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3 (4), 95-102.