

Etat des connaissances en 2013 sur les plantes génétiquement modifiées

Dominique Job¹

Dossier réalisé à la demande de l'Académie d'agriculture de France dans le cadre du groupe de réflexion et de proposition sur les plantes génétiquement modifiées (actualisé le 18 novembre 2013)

¹ *membre de l'Académie d'agriculture*

directeur de recherche émérite au CNRS

Laboratoire mixte CNRS / Université Claude Bernard Lyon / INSA / Bayer CropScience (UMR CNRS 5240)

14, impasse Pierre Baizet

69009, Lyon – France

job.dominique@gmail.com

1. Préambule

Le présent état des connaissances (novembre 2013) sur les plantes génétiquement modifiées (PGM ; également nommées *genetically engineered plants* dans les pays anglo-saxons) s'est largement inspiré de deux publications, l'une synthétisant les connaissances sur le transfert de gènes chez les plantes¹, et l'autre résultant d'une étude sur les biotechnologies et nouvelles variétés végétales réalisée récemment par le groupe BioPaGe du CGAAER (Conseil général de l'alimentation, de l'agriculture et des espaces ruraux) du ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement du territoire². Des informations générales sont également disponibles sur le site Internet de l'Association française des biotechnologies végétales³ et sur celui de « *the national academies press* » décrivant l'impact des PGM sur la production agricole aux Etats-Unis⁴.

2. Introduction

Les plantes transgéniques (PGM) sont des plantes dont le génome a été modifié par transgenèse *via* l'introduction d'un ou plusieurs gènes. En recherche fondamentale, la production de PGM est un outil de base pour la compréhension des mécanismes cellulaires. En agronomie, elle représente l'une des dernières évolutions des méthodes d'amélioration des plantes. Dans de nombreux cas, l'objectif est d'introduire un nouveau trait, non présent dans cette espèce préalablement. L'objectif général est de créer des plantes non seulement capables de produire plus et plus rapidement des produits adaptés aux goûts des consommateurs et aux contraintes de la commercialisation mais également d'être moins exigeantes en eau, en intrants et en pesticides⁵.

¹ Chupeau Y., 2006. Le transfert de gènes chez les plantes, mise en perspective. *Le Sélectionneur Français* **57**: 3-24.

² Rapport sur les Biotechnologies et nouvelles variétés végétales (2012 ; http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/CGAAER_10157_2012_Rapport_cle015844.pdf).

³ <http://www.biotechnologies-vegetales.com/>.

⁴ The impact of genetically engineered crops on farm sustainability in the United States (The National Academies Press, 2012, http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=12804&page=R1).

⁵ On peut mentionner par exemple la question de l'utilisation des engrais azotés (McAllister CH, Beatty PH, Good AG., 2012. Engineering nitrogen use efficient crop plants: the current status. *Plant Biotechnology Journal* **10**: 1011-1025). Au cours des 40 dernières années, la quantité d'azote synthétique appliquée aux cultures a considérablement augmenté, entraînant une augmentation significative du rendement, mais avec des impacts négatifs sur l'environnement. La nécessité de développer des cultures supportant une baisse des niveaux d'engrais azotés sans impact sur les rendements a été reconnue dans l'appel à une deuxième Révolution Verte lancé en septembre 2006 par Jacques Diouf, Directeur général de la FAO (<http://www.fao.org/newsroom/fr/news/2006/1000392/index.html>). De fait, la recherche dans le domaine de l'efficacité d'utilisation de l'azote a vu des progrès considérables avec l'identification de gènes impliqués dans cette utilisation chez les plantes modèles et cultivées, notamment concernant les voies relatives à l'absorption et l'assimilation de l'azote, la biosynthèse des acides aminés, le stockage et le métabolisme de l'azote, la signalisation et la régulation du métabolisme

2.1 Données historiques

L'obtention des PGM se base sur la modification de l'information génétique au niveau de l'ADN, nécessitant l'utilisation de toute une gamme d'outils biotechnologiques (croisements, mutagenèse, transgenèse, cisgenèse, sélection génomique) dont certains (croisements et mutagenèse) sont également utilisés dans les méthodes de sélection classique. Une telle possibilité découle directement de la découverte de la structure moléculaire de l'ADN en 1953, de l'essor de la biologie moléculaire dans les années 60 (découverte des enzymes de restriction, des protéines capables de découper l'ADN à des sites spécifiques, ...) ⁶, et enfin du développement du génie génétique (technologie de l'ADN recombinant) qui permet la manipulation *in vitro* de portions précises d'ADN et donc des gènes ^{1,7}.

Trente ans après la démonstration du potentiel qu'offrait l'utilisation de la bactérie tellurique *Agrobacterium tumefaciens* ⁸ pour développer les biotechnologies végétales ⁹, les recherches effectuées ont vu des avancées considérables, tant pour la recherche fondamentale (connaissance du système plante) que pour la recherche d'applications ^{10,11,12}. Il faut souligner ici l'importance des recherches effectuées sur l'amélioration des techniques de transfert de gènes permettant de s'affranchir de l'étape fastidieuse et le plus souvent limitante de la culture *in vitro*. Après les succès initiaux obtenus par l'inoculation de graines d'*Arabidopsis thaliana* ¹³ en germination ¹⁴, la mise au point de l'infiltration d'agrobactéries

et de la translocation de l'azote, sa remobilisation ainsi que les mécanismes de la sénescence des plantes.

⁶ Morange M., 2003. Histoire de la biologie moléculaire. Collection : La Découverte Poche / Sciences humaines et sociales n° 145, 378 p.

⁷ Manipulation en laboratoire d'ADN dans laquelle de l'ADN, ou des fragments d'ADN de différentes sources, sont coupés puis recombinés au moyen d'enzymes. Cet ADN recombinant est ensuite inséré dans un organisme vivant.

⁸ *Agrobacterium tumefaciens* est un parasite génétique causant la maladie du collet par insertion dans le génome des cellules végétales infectées d'une portion d'ADN nommé T-DNA (pour Transferred-DNA) codant des gènes pouvant synthétiser des opines dont la bactérie se sert de substrat nutritif et des phytohormones provoquant la formation de tumeurs cancéreuses.

⁹ Van Montagu M., 2011. It is a long way to GM agriculture. *Annual Review of Plant Biology* **62**: 1-23.

¹⁰ Privalle LS, Chen JW, Clapper G, Hunst P, Spiegelhalter F, Zhong CX., 2012. Development of an agricultural biotechnology crop product: testing from discovery to commercialization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**: 10179-10187.

¹¹ Schnepf E *et al.*, 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 775-806.

¹² Wang WX, Vinocur B, Altman A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**: 1-14.

¹³ Cette plante est un organisme modèle pour la recherche génétique dans le monde végétal. En 2000, ce fut le premier génome végétal séquencé. Les raisons de ce choix sont nombreuses : petite taille ; cycle de développement court (deux mois de la graine à la graine) ; un plant produit environ 40 000 graines ; c'est un des plus petits génomes connus dans le monde végétal. **Référence** : Somerville C, Koornneef M., 2002. A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nature Reviews Genetics* **3**: 883-889.

sous vide partiel a fourni une procédure simple et pratique¹⁵, permettant de générer rapidement et à haut débit les premières collections de mutants d'insertion¹⁶ chez *Arabidopsis*^{17,18}, aujourd'hui riches de plusieurs centaines de milliers de lignées mutantes, et dont l'utilisation s'avère décisive pour la compréhension du rôle des gènes chez les plantes¹⁹.

Les premiers OGM décrits furent en 1973²⁰ des bactéries, suivis, en 1974²¹, par des souris transgéniques puis une première plante génétiquement modifiée en 1983²². Au plan finalisé, l'insuline, bioproduite à partir de la bactérie *Escherichia coli*, fut la première protéine recombinante sur le marché du médicament et fut commercialisée en 1982 par la Compagnie Eli Lilly²³. Par ailleurs, les premiers aliments génétiquement modifiés ont été mis sur le marché en 1994 (eg la tomate Flavr Savr, une variété de tomate transgénique produite par la société Calgene, rendue plus résistante au pourrissement par l'ajout d'un gène antisens qui interfère avec la production d'une enzyme, la polygalacturonase²⁴). Les premiers essais de PGM en France datent de 1987, avec l'expérimentation au champ, par l'Institut du tabac de Bergerac, en collaboration avec Rhône-Poulenc Agrochimie, d'un tabac résistant à un herbicide, le bromoxynil²⁵.

Depuis ces travaux pionniers, la culture des PGM a connu un essor considérable. Ainsi, aux Etats-Unis, elles représentent aujourd'hui 91% des cultures de soja, 87% des cultures de coton et 73% des cultures de maïs⁴. L'un des principaux avantages invoqués pour

¹⁴ Feldmann KA, Marks MD., 1987. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. *Molecular and General Genetics* **208**: 1-9.

¹⁵ Bechtold N, Ellis J, Pelletier G., 1993. *In planta Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **316**: 1194–1199.

¹⁶ Ce type de mutagenèse génère des mutants qui, le plus souvent, sont des allèles nuls ou ayant une expression modifiée.

¹⁷ Salk Institute Genomic Analysis Laboratory - *Arabidopsis* sequence indexed TDNA insertion http://signal.salk.edu/tdna_FAQs.html.

¹⁸ *Arabidopsis thaliana* Resource Centre for Genomics IJPB, INRA de Versailles, http://www-ijpb.versailles.inra.fr/en/cra/cra_accueil.htm.

¹⁹ O'Malley RC, Ecker JR., 2010. Linking genotype to phenotype using the *Arabidopsis* unimutant collection. *Plant Journal* **61**: 928-940.

²⁰ Cohen SN *et al.*, 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **70**: 3240-3244.

²¹ Jaenish R, Mintz B., 1974. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **71**:1250-1254.

²² Herrera-Estrella L., 1992. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. 1983. *Biotechnology* **24**: 377-381.

²³ <http://www.nytimes.com/1982/10/30/us/a-new-insulin-given-approval-for-use-in-us.html>.

²⁴ La FDA (Food and Drug Administration des Etats-Unis) décida qu'il n'était pas nécessaire de prévoir un étiquetage particulier pour ces tomates modifiées parce qu'elles présentaient les caractéristiques essentielles des tomates non modifiées. En l'espèce, il n'y avait aucune preuve de risques pour la santé humaine, et leur contenu nutritionnel était inchangé. Toutefois, cette tomate s'est révélée rapidement un échec commercial, inapte à concurrencer les variétés classiques tant par ses qualités organoleptiques insuffisantes que par son prix trop élevé.

²⁵ Haloarylnitrile degrading gene, its use, and cells containing the gene. 1987. EP 0373173 A1 (Source du texte : WO1989000193A1) ; <http://www.google.com/patents/EP0373173A1?cl=en>.

expliquer cet engouement est que leur utilisation facilite le travail des agriculteurs, notamment en simplifiant le désherbage des cultures.

Si la plupart des PGM actuelles sont générées à partir du transfert dans la plante cible de fragments d'ADN codant une ou plusieurs protéines particulières (à l'origine du trait agronomique recherché), il convient de signaler les recherches effectuées pour transférer des fragments d'ADN ne codant pas des protéines comme ceux codant des riborégulateurs (microARN ou miARN)²⁶ et dont l'expression affecte le développement des plantes, par exemple le rythme circadien²⁷ ou la résistance aux virus²⁸.

2.2 Champ d'application des PGM (quelques exemples)

Ces nouvelles technologies moléculaires permettent et mettent à profit une exploitation accrue de la variabilité naturelle existant chez les plantes, tant pour les caractères agronomiques qu'organoleptiques. En ce sens, l'utilisation de cette variabilité naturelle, qui peut être qualifiée d'approche biomimétique, ne créerait pas de nouvelles espèces végétales *per se*. Mise en place dès la domestication des espèces végétales au néolithique, cette approche est aujourd'hui considérablement accélérée par les apports de la génomique, notamment la connaissance des génomes des plantes, et le développement des techniques de génomique fonctionnelle (ciblage des mutations, transgénèse). Toutefois, un autre objectif des biotechnologies végétales est de créer de nouvelles plantes n'existant pas dans la nature (dans l'état des connaissances sur la biodiversité), par exemple obtenir des plantes produisant des médicaments²⁹, vaccins³⁰ ou biomatériaux (eg bioplastiques³¹), améliorer la qualité du bois³², modifier la nature des réserves accumulés dans les grains ou tubercules

²⁶ Les microARN (miARN) sont de petits ARN (une vingtaine de nucléotides) endogènes qui régulent l'expression des gènes chez les plantes et les animaux. L'importance de ces miARN dans la régulation des gènes au cours du développement est aujourd'hui clairement établie. Identifiés chez les plantes il y a une dizaine d'années, les miARN sont connus pour jouer de nombreux rôles essentiels à chaque étape majeure du développement, généralement au niveau des réseaux de régulation génétique, ciblant des gènes qui jouent eux-mêmes un rôle régulateur, tels que ceux codant les facteurs de transcription.

²⁷ Allen E *et al.*, 2012. Brevet international «Temporal regulation of gene expression by MicroRNAs » (<http://www.patentgenius.com/patent/8314290.html>).

²⁸ Qu J *et al.*, 2007. Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. *Journal of Virology* **81**: 6690-6699.

²⁹ Boyhan D, Daniell H., 2011. Low-cost production of proinsulin in tobacco and lettuce chloroplasts for injectable or oral delivery of functional insulin and C-peptide. *Plant Biotechnology Journal* **9**: 585-598.

³⁰ Soria-Guerra RE, Moreno-Fierros L, Rosales-Mendoza S., 2011. Two decades of plant-based candidate vaccines: a review of the chimeric protein approaches. *Plant Cell Reports* **30**: 1367-1382.

³¹ Mooney BP., 2009. The second green revolution? Production of plant-based biodegradable plastics. *Biochemical Journal* **418**: 219-232.

³² Boerjan W., 2005. Biotechnology and the domestication of forest trees. *Current Opinion in Biotechnology* **16**: 159-166.

(eg modifier par transgénèse les taux de vitamines³³ ou autres composés essentiels tels que les acides aminés essentiels³⁴) ou encore, créer de nouvelles plantes pour la phytoremédiation de sols contaminés³⁵, par exemple par des explosifs toxiques³⁶.

Le développement des PGM suscite l'espoir de relever un défi démographique sans précédent. D'ici à 2050, la population devrait augmenter de 40% dans le monde pour atteindre 9 milliards d'habitants³⁷. L'Organisation Mondiale de la Santé estime que plus de trois milliards de personnes souffrent de malnutrition par manque de calories et carences en protéines, fer, iode et/ou en vitamines A, B, C et D³⁸.

Au plan commercial, les exemples les plus récents de PGM concernent l'obtention de plantes transgéniques tolérantes aux herbicides ou résistantes à des maladies dévastatrices contrôlables, jusqu'à présent, par une utilisation importante de pesticides. Parmi les réalisations les plus prometteuses³⁹, on peut citer par exemple **un haricot transgénique résistant au virus de la mosaïque dorée**, entièrement conçu au Brésil par l'Embrapa (Institut public de recherche brésilien) et dont la culture a été autorisée au Brésil (septembre 2011) par la Commission nationale de biosécurité (CTNBio). La mosaïque dorée, maladie virale (BYMV ; bean yellow mosaic virus) transmise par une « mouche blanche », est responsable d'importantes pertes de rendement pouvant aller jusqu'à 85% de la récolte.

Par ailleurs, BASF Agro a présenté en octobre 2011 une demande d'autorisation européenne pour la culture et la consommation d'une variété de **pomme de terre génétiquement modifiée résistante au mildiou**⁴⁰. Le mildiou de la pomme de terre (*Phytophthora infestans*) est un oomycète particulièrement virulent qui peut occasionner des pertes de rendement considérables (cause de la grande famine en Irlande au milieu du XIX^{ème} siècle) et qui nécessite de nombreux traitements fongicides. La pomme de terre GM baptisée « Fortuna » dont la mise sur le marché interviendrait en 2014-2015 est une variété

³³ Paine JA *et al.*, 2005. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology* **23**: 482-487.

³⁴ Galili G, Amir R., 2013. Fortifying plants with the essential amino acids lysine and methionine to improve nutritional quality. *Plant Biotechnology Journal* **11**: 211-222.

³⁵ Pilon-Smits E., 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 15-39.

³⁶ Van Aken B., 2009. Transgenic plants for enhanced phytoremediation of toxic explosives. *Current Opinion in Biotechnology* **20**: 231-236.

³⁷ http://www.statistiques-mondiales.com/croissance_population.htm.

³⁸ <http://www.delaplanete.org/population-mondiale-agriculture-et.html>.

³⁹ Il existe des contre-exemples. On peut ainsi citer la rétractation récente (septembre 2012 ; Abhary M *et al.*, 2012. Transgenic biofortification of the starchy staple cassava (*Manihot esculenta*) generates a novel sink for protein. *PLoS ONE* **6**: e16256) décrivant la possibilité de transformer une plante (le manioc) riche en amidon en une plante riche en amidon et en protéines, et dont le développement aurait permis l'émergence d'applications tant en nutrition animale et humaine que pour des objectifs finalisés. Suite à la publication de l'article, les auteurs n'ont pu, dans des études ultérieures, confirmer la présence du transgène dans les plantes transgéniques.

⁴⁰ Buttler D., 2010. A new dawn for transgenic crops in Europe? <http://www.nature.com/news/2010/100309/full/news.2010.112.html>.

dérivée de la variété conventionnelle « Fontane », à laquelle on a transféré deux gènes de résistance au mildiou issus d'une pomme de terre sauvage d'Amérique du sud. L'apport de la transgénèse s'est ici avéré décisif car les méthodes de sélection par voie classique ne sont jamais parvenues à conférer une résistance suffisante au mildiou. Toutefois, face aux incertitudes liées au cadre réglementaire européen et aux menaces de destruction de champs, BASF a renoncé au développement de cette variété de pomme de terre en Europe, et décidé de recentrer ses activités dans ce secteur sur les Etats-Unis et l'Amérique latine.

Signalons également les travaux très ambitieux conduits par le groupe de Biotechnologie végétale de l'ETH à Zurich, Suisse⁴¹, portant sur l'amélioration (amélioration nutritionnelle et résistance aux virus notamment) par transgénèse du **manioc**, une plante vivrière capitale dans les pays tropicaux et subtropicaux. Le manioc est en effet la 5^{ème} plante la plus cultivée au monde, servant de nourriture journalière à plus de 600 millions de personnes^{42,43}. D'autres travaux sont conduits sur cette même plante dans le cadre du programme *Virus Resistance for Cassava in Africa* (VIRCA)⁴⁴, dont le but est de contrôler deux maladies virales, causées par quatre virus différents, via l'utilisation du génie génétique, et de fournir gratuitement aux agriculteurs des variétés résistantes à la mosaïque et à la striure nécrotique du manioc⁴⁵. Le programme VIRCA existe depuis six ans et a déjà fourni les preuves du contrôle de ces deux maladies sous serre et aussi dans les champs en Afrique de l'Est. Pour ce faire, ce programme a produit des maniocs transgéniques résistants à chacun des quatre virus cibles. Le programme VIRCA a mis en place des équipes complètes aux Etats-Unis et dans trois pays d'Afrique, l'Ouganda, le Kenya et le Nigeria, pour conduire tous les tests nécessaires avant la commercialisation, prévue à partir de 2016.

En 1992, la production de la papaye à Hawaï fut réduite à néant par un virus, le virus en ronds tachetés de la famille des potyvirus (98% des papayers atteints). Le **papayer transgénique** (variétés « SunUp » et « Rainbow »), introduit en 1998, a permis de sauver la filière de la papaye de la faillite en protégeant ces cultures des attaques de ce virus⁴⁶. Il n'y a pas de résistance connue chez le papayer. Cette résistance a été obtenue par expression de

⁴¹ <http://www.pb.ethz.ch/research/cassava>.

⁴² Vanderschuren H., 2012. Strengthening African R&D through effective transfer of tropical crop biotech to African institutions. *Nature Biotechnology* **30**: 1170-1172.

⁴³ <http://www.scidev.net/en/sub-suharan-africa/news/african-farmers-could-soon-grow-virus-resistant-cassava-1.html>.

⁴⁴ http://www.danforthcenter.org/science/programs/international_programs/virca/.

⁴⁵ Fauquet CM., 2012. Des maniocs transgéniques pour endiguer deux pandémies virales en Afrique de l'Est. Communication à l'Académie d'Agriculture de France (http://www.academie-agriculture.fr/mediatheque/seances/2012/20120215_resume4.pdf?PHPSESSID=21934c36a1fb90ae4bf2ce5a29ecd338).

⁴⁶ Gonsalves D., 1998. Control of papaya ringspot virus in papaya. A case study. *Annual Review of Phytopathology* **36**: 412-437.

la protéine de capsid du virus, protéine enfermant l'ARN viral⁴⁷. Les rendements en papaye ont été multipliés par 25 (140 t/ha contre 5-6 t/ha). La résistance est toujours stable, depuis plus de 10 ans. Aujourd'hui la papaye transgénique représente 80% de la papaye à Hawaï. On observe, de plus, un effet protecteur de la culture de papayers transgéniques pour les cultures non transgéniques : les pucerons virulifères seraient purgés de leur virus en passant sur les variétés transgéniques avant de fréquenter les cultures non transgéniques.

2.3 Les générations successives de PGM

Les PGM de **première génération** résultent principalement de l'introduction d'un **unique** transgène dans les plantes cibles pour conférer par exemple une tolérance à un herbicide total⁴⁸ (eg un transgène codant une forme mutée de la cible de l'herbicide, non sensible à cet herbicide⁴⁹) ou une résistance à certains insectes (eg les lépidoptères ; cas des protéines Bt⁵⁰). Cette introduction rapide de telles PGM et le développement intensif des pratiques culturales liées à ces plantes ont cependant mis en évidence des limitations à cet essor, notamment concernant la rapidité avec laquelle se développent les phénomènes de résistance chez les mauvaises herbes⁵¹ et insectes ciblés. Pour pallier ces difficultés, il est

⁴⁷ Ferreira SA *et al.*, 2002. Virus coat protein transgenic papaya provides practical control of papaya ringspot virus in Hawaï. *Plant Disease* **86**: 101-105.

⁴⁸ Un herbicide total est un herbicide (désherbant) efficace sur l'ensemble des adventices et aussi des espèces cultivées. Ces molécules ciblent une voie essentielle du métabolisme ou du développement des plantes. On peut mentionner le glyphosate qui agit en bloquant l'enzyme 5-énoyl-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS ; voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques), les imidazolinones et sulfonilurées qui bloquent la synthèse des acides aminés branchés au niveau de l'acétolactate synthase (ALS) ou les molécules de la famille des fop/dime et pinoxaden, des herbicides antigaminées qui inhibent l'acétyl-coenzyme A carboxylase (ACCase) dans les chloroplastes (biosynthèse des acides gras).

⁴⁹ http://www.sourcewatch.org/index.php/Roundup_Ready_Crops. **Référence** : Funke T *et al.*, 2006. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **103**: 13010–13015.

⁵⁰ Il s'agit de toxines fabriquées par *Bacillus thuringiensis*, une bactérie insecticide. Avec l'avènement des biotechnologies, il a été possible d'intégrer des gènes d'endotoxines de Bt spécifiques dans les génomes de plantes, créant ainsi des cultures génétiquement modifiées – les 'cultures Bt' par exemple chez le maïs, la pomme de terre, le coton ou le soja. **Référence** : Hofte H, Whiteley HR., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews* **53**: 242-255.

⁵¹ L'apparition rapide de mauvaises herbes résistantes au glyphosate est l'un des principaux problèmes lié à l'exploitation à grande échelle des PGM tolérantes à cet herbicide. Aux Etats-Unis, ces mauvaises herbes envahissent les champs de soja, de maïs, de coton et de colza. En 2012, près de 8 millions d'hectares sont d'ores et déjà infestés par des mauvaises herbes résistantes au glyphosate. Près de 37 millions d'hectares ont été touchés par des espèces parmi les plus résistantes. L'Académie américaine des sciences a organisé le 10 mai 2012 un sommet sur les plantes génétiquement modifiées résistantes aux herbicides (<http://nas-sites.org/hr-weeds-summit/>).

Dans le cas de la tolérance aux herbicide totaux (eg glyphosate), il convient d'observer que cette résistance des populations d'adventices n'est pas due à l'acquisition du transgène par croisement, impossible à court terme entre plantes d'espèces trop éloignées, mais résulte de la sélection chez ces populations de mécanismes multiples aboutissant à la survie des adventices même sous doses croissantes de l'herbicide. Ainsi, la tolérance au glyphosate d'origine transgénique, volontairement conférée à l'espèce cultivée, a engendré une résistance non transgénique au glyphosate des adventices acquise par sélection involontaire sous la pression des épandages

possible, à partir de ces PGM, de réaliser des croisements permettant un empilement de gènes de résistance à des herbicides totaux et des insectes ravageurs.

Les progrès spectaculaires de la génétique moléculaire, la connaissance de plusieurs génomes de plantes et l'amélioration des techniques de transformation ont permis le développement de nouvelles PGM dans lesquels **plusieurs gènes** sont introduits. Il est ainsi possible d'introduire par transgénèse dans une plante cible une voie métabolique complète. De fait, les possibilités ouvertes par ces PGM dites de **seconde génération** sont considérables. Ces nouvelles PGM visent des objectifs de sécurité alimentaire (eg le riz doré enrichi en provitamine A⁵² ; plantes fabricant diverses molécules biopharmaceutiques) et la mise au point de plantes économiquement plus performantes (tolérance aux conditions environnementales défavorables, réduction des intrants).

2.4 Données factuelles

Une interrogation (janvier 2013) de la base de données PubMed Web of Science⁵³ sous la rubrique « *Plant biotechnology* » a révélé l'existence de près de 10 000 publications sur la question depuis 1981. Des PGM de grande culture, notamment le soja, le maïs, le colza (canola) et le coton, ayant été cultivées commercialement dès 1996⁵⁴, on dispose aujourd'hui d'un certain recul sur l'impact agronomique, sociétal et environnemental de telles cultures.

La source principale d'information sur les données de mise en culture des PGM dans le monde est l'ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications,

répétitifs de l'herbicide. L'avantage et la facilité agronomiques apportés par la plante tolérante aux herbicides sont ainsi annihilés par l'acquisition symétrique de résistance par les mauvaises herbes que l'on voulait détruire.

D'autres types de résistance à des herbicides sont répertoriés (http://www.terre-net.fr/dossier_special/herbicides-2011/?idRub=2685&id=75027).

⁵² Le « riz doré » ou « Golden Rice » est une variété de riz (*Oryza sativa*) produit par une modification génétique touchant la voie de biosynthèse du précurseur bêta-carotène de la provitamine A dans les parties comestibles du grain de riz. Le riz doré a été inventé comme aliment enrichi pour être utilisé dans les zones où les populations souffrent d'une carence en vitamine A (vitamine indispensable à la vision). Au moment de sa création, en 2000, le riz doré était considéré comme une découverte capitale en biotechnologies car les chercheurs avaient élaboré une voie de biosynthèse entière à partir de divers organismes (plantes, bactéries) pour la transférer dans le riz et la faire exprimer spécifiquement dans le grain. L'accumulation de caroténoïdes (précurseurs de la provitamine A) est telle chez les grains du riz transgénique qu'elle leur confère une couleur jaune, à la base de l'appellation de riz doré. **Références** : Ye X *et al.*, 2000. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* **287**: 303-305 ; Paine JA *et al.*, 2005. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology* **23**: 482-487.

⁵³ <http://bibliovie.inist.fr/>.

⁵⁴ Mannion AM, Morse S., 2012. Biotechnology in agriculture: Agronomic and environmental considerations and reflections based on 15 years of GM crops. *Progress in Physical Geography* **36**: 747-763.

<http://www.isaaa.org/inbrief/default.asp>). L'ISAAA est une organisation à but non lucratif, soutenue notamment par l'ONU *via* la FAO, qui encourage le développement des plantes modifiées par les biotechnologies à l'intention des agriculteurs des pays en développement.

En 2012, les PGM ont été cultivées dans le monde sur **170 millions d'ha, soit près de 13 % des 1,5 milliard d'hectares de terres cultivées** (5,4 fois les surfaces agricoles utiles françaises ; une progression de 6% par rapport à 2011), par près de **17 millions d'agriculteurs issus de 29 pays** (19 pays émergents et 10 pays industrialisés), principalement en Amérique⁵⁵ et en Asie. Une telle situation représente une multiplication par un facteur près de 100 du nombre d'hectares plantés depuis 1996, faisant ainsi des cultures biotechnologiques, la technologie agricole la plus rapidement adoptée dans l'histoire moderne⁵⁶.

Au plan mondial, les principaux caractères des PGM cultivées à présent sont la tolérance aux herbicides, la résistance aux insectes et la résistance aux insectes combinée à la tolérance aux herbicides. En 2012, 13 pays ont cultivé des PGM avec une association de transgènes ayant des propriétés complémentaires concernant au moins deux caractères. À noter que 10 d'entre eux étaient des pays émergents. En 2012, environ 43,7 Mha, soit 26% des 170 Mha totalisés correspondaient à des cultures de plantes comportant des associations de transgènes.

Parmi les 28 pays qui ont cultivé des PGM en 2012, 20 sont des pays émergents et huit des pays industrialisés. Ainsi, parmi les pays cultivant des PGM, ceux en développement sont près de trois fois plus nombreux que les pays industrialisés. Par exemple, en 2012, 7,2 millions d'agriculteurs en Chine et autant en Inde ont, collectivement, cultivé une superficie d'environ 15 Mha avec des PGM. Plus de la moitié de la population mondiale, représentant 60% ou 4 milliards de personnes, vit dans les 28 pays cultivant des PGM. Pour la première fois en 2012, les pays en développement ont cultivé plus de PGM (52%) que les pays industrialisés. Les cinq pays émergents, chefs de file dans le domaine des cultures transgéniques, sont la Chine et l'Inde en Asie, le Brésil et l'Argentine en Amérique latine, ainsi que l'Afrique du Sud. Ils ont, collectivement, cultivé 78,2 Mha (46% du total) et, ensemble, ils représentent environ 40% de la population mondiale.

Alors que la production agricole européenne est une des plus importantes au monde, la part des cultures de PGM y est extrêmement faible. Ainsi, en 2012, cinq pays européens (Espagne, Portugal, République Tchèque, Slovaquie et Roumanie) ont cultivé une superficie

⁵⁵ The Impact of GE Crops on Farm Sustainability in the United States, 2010. *The National Academies Press* (http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=12804).

⁵⁶ <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/pressrelease/default.asp>.

de 130 000 hectares de maïs Bt génétiquement modifié. L'Espagne cultivait à elle seule 90% de la superficie européenne de maïs Bt, soit 116 000 hectares. Par comparaison, le Burkina Faso cultive une surface de PGM supérieure à celle cumulée de toute l'Europe.

Contrairement à leur perception négative en Europe, les données accumulées ces 15 dernières années dans les pays émergents et les pays industrialisés montrent globalement un impact positif de ces cultures GM tant au plan agronomique qu'environnemental. Ainsi, elles ont permis des augmentations notables des rendements, principalement par réduction des pertes causées par les ravageurs et le contrôle des mauvaises herbes. Grâce à l'utilisation des plantes tolérantes à un herbicide, le désherbage est simplifié, permettant à l'agriculteur d'adopter une méthode dite de culture sans labour, laquelle permet un gain de temps, des économies d'énergie (carburant) et de pesticides, et une moindre érosion des sols. S'agissant de l'environnement, la diminution de l'utilisation des insecticides de synthèse a été bénéfique pour les espèces non visées et les insectes bénéfiques. De plus, les problèmes de santé humaine rencontrés avec l'utilisation des pesticides traditionnels ont également diminué⁴.

3. Les différentes périodes de l'amélioration des plantes

Deux contraintes guident la transformation des espèces sauvages vers des espèces domestiquées. La première réside dans la nécessité d'obtenir un caractère différent (variabilité existant entre les individus) et si possible aisé à repérer (le fruit est plus gros, les graines sont plus nombreuses, la fleur est de couleur différente et arrive plus précocement, la germination se produit plus vite). Pour exercer un choix sur un caractère recherché, la deuxième contrainte est de pouvoir sélectionner et multiplier l'individu porteur, *via* la reproduction. Le travail de l'homme va être de favoriser l'émergence des individus porteurs du caractère recherché en leur donnant des conditions favorables ou en les aidant à se reproduire s'ils ne peuvent le faire naturellement. A partir de ces deux exigences - nécessité de révéler la variabilité visible ou non et nécessité de promouvoir la reproduction des individus porteurs du caractère recherché, il est possible de distinguer les différentes périodes de l'amélioration des plantes.

Une première période, dite préscientifique, correspond à une série de tâtonnements où seul le suivi du phénotype guide la sélection, sans réelle connaissance des mécanismes mis en jeu^{57,58}.

⁵⁷ Doebley JF, Gaut BS, Smith BD., 2006. The molecular genetics of crop domestication. *Cell* **127**: 1309-1321.

Une deuxième période, dite scientifique, exploite les connaissances, par exemple sur la reproduction, pour diriger plus facilement les croisements en fonction des traits recherchés. A cette fin deux grandes techniques sont utilisées. L'une concerne les **hybridations** (interspécifiques, intraspécifiques, et élargies) qui permettent divers types de croisements, dont l'hybridation élargie qui permet notamment le croisement, naturellement impossible, entre deux espèces très différentes, et qui est forcé en culture *in vitro*. Dans une étape dite de « sauvetage des embryons », le phénomène naturel d'avortement des embryons obtenus est stoppé avant le début de sa réalisation. Quelques rares embryons viables sont sauvés et mis en culture de tissu. La survie d'une cellule, d'un embryon et d'un individu résulte du succès après nombre d'essais. L'autre concerne les **mutations** qui entraînent une modification de l'information génétique dans la séquence de l'ADN. Elles sont l'une des causes principales de l'évolution des espèces et expliquent l'existence d'une variabilité entre les gènes. Elles peuvent être spontanées, induites ou somaclonales. Le séquençage à haut débit des génomes permet de faire des comparaisons, au nucléotide près, entre une plante et l'un de ses descendants par reproduction sexuée. Il en ressort que le taux spontané de mutations (changement au niveau de l'ADN sans préjuger de son effet sur un gène) est de l'ordre de 1 sur 140 millions de nucléotides⁵⁹. La même comparaison cette fois entre une plante et un descendant après traitement mutagène (comme par exemple avec le méthanesulfonate d'éthyle ; mutagénèse EMS) fait ressortir de son côté une multiplication de ce taux par un facteur 500 environ⁶⁰. Des techniques récentes exploitent les mutations induites (TILLING)⁶¹ ou spontanées (ecoTILLING)⁶² dans les génomes pour ne sélectionner que celle(s) qui est (sont) responsable(s) de la modification du trait considéré.

La troisième période, enfin, correspond à l'avènement des biotechnologies. Depuis une trentaine d'années, le développement de nouveaux outils a permis de produire des plantes qui répondent de mieux en mieux aux demandes et contraintes sociales ou environnementales et d'entrevoir la possibilité de sélectionner des variétés sur des caractères qui étaient jusqu'alors considérés comme difficiles à améliorer (rendement, résistance, adaptation).

⁵⁸ Job D, Pelletier G, Pernellet JC (eds, dans le cadre du 250^{ème} anniversaire de l'Académie d'Agriculture de France), 2011. On the trail of domestications and migrations in agriculture. *Comptes Rendus Biologies* **34**: 169-262.

⁵⁹ Ossowski S *et al.*, 2010. The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **327**: 92-94.

⁶⁰ Greene EA *et al.*, 2003. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics* **164**: 731-740.

⁶¹ McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S., 2000. Targeted screening for induced mutations. *Nature Biotechnology* **18**: 455-457.

⁶² Comai L, Young K, Till BJ, Reynolds SH, Greene EA, Codomo CA, Enns LC, Johnson JE *et al.*, 2004. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by EcoTilling. *Plant Journal* **37**: 778-786.

4. Les technologies moléculaires d'obtention des variétés végétales

4.1 La transgénèse

4.1.1 Définitions

D'une façon générale, la transgénèse consiste à introduire un gène supplémentaire dans le génome d'un organisme vivant. La séquence d'ADN transférée est en général une construction qui comprend trois séquences :

- **un promoteur** qui permet de contrôler l'expression du gène dans un organe ou un tissu à un moment donné. Il peut être constitutif, avec une expression permanente dans tous les organes, ou inductible sous l'action d'un signal interne à la plante ou déclenché par un facteur extérieur, par exemple une piqûre d'insecte. Ce dernier type de promoteurs fait l'objet de recherches importantes. Ainsi une plante résistante aux insectes ne produirait la protéine ou tout autre molécule toxique pour les insectes que s'il y avait un début d'attaque de la plante par les insectes ;
- **la séquence codante du gène d'intérêt**, assortie d'introns intervenant dans son fonctionnement ;
- **une séquence de fin de lecture.**

Le transfert lui-même peut se faire selon deux procédés, indirect ou direct. Le transfert **indirect** est provoqué par l'intermédiaire d'une bactérie, *Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie, agent de la galle du collet chez les plantes, possède la propriété remarquable de transférer naturellement à la plante une séquence de son ADN (dit ADN-T) pour lui faire produire des substances dont elle a besoin pour son développement. Le principe est alors de remplacer cet ADN-T par le gène à transférer : la bactérie insère alors ce gène dans le génome de la plante. Ce transfert se fait à partir de fragments de tissus de la plante co-cultivés *in vitro* avec la bactérie⁶³. A noter que le prestigieux Prix Mondial de l'Alimentation (World Food Prize ; le « Nobel de l'Alimentation ») a été, en 2013, attribué à trois pionniers de l'avènement des PGM, Robert Fraley, Mary Dell Chilton et Marc Van Montagu. Un tel prix récompense des personnalités travaillant à lutter contre la faim dans le monde (http://www.worldfoodprize.org/en/about_the_prize/about_the_world_food_prize_french/).

Le transfert **direct** est réalisé par projection à très grande vitesse (sur des cellules, des fragments de tissus, des méristèmes ou des embryons immatures, cultivés *in vitro*) de

⁶³ Une bactérie très proche d'*Agrobacterium tumefaciens*, la bactérie *Agrobacterium rhizogenes* est utilisable de la même manière. L'ADN transféré est alors porté par un plasmide nommé pRi.

microbilles de métal porteuses du gène à transférer. C'est la technique de biolistique^{64,65}. D'autres techniques de transfert direct reposent sur la perméabilisation des protoplastes en présence de polyéthylène glycol ou par électroporation¹. Ces techniques de transfert direct sont encore très utilisées, notamment chez les espèces cultivées, en raison de la difficulté de nombreuses espèces végétales par *Agrobacterium tumefaciens*. Les mécanismes moléculaires d'une telle difficulté sont encore inconnus. Toutefois, les recherches sur des écotypes d'*Arabidopsis* montrant une efficacité variable de transformation via *Agrobacterium tumefaciens* ont permis la mise en évidence de gènes impliqués dans ce mécanisme (les gènes « rat » pour *resistance to Agrobacterium transformation*), ouvrant ainsi de nouvelles pistes à une application chez les plantes cultivées⁶⁶.

Dans les méthodes actuelles de la transgénèse, le site d'insertion du transgène n'est pas maîtrisé. Des recherches en cours, déjà très avancées, permettront, d'une part d'insérer le transgène à un locus choisi à l'avance en utilisant le procédé de recombinaison homologue, et, d'autre part, de modifier de façon ciblée un gène de la plante.

4.1.2 La question des gènes marqueurs (gènes de sélection)

Suite à la mise en œuvre de l'une des techniques de transgénèse mentionnées ci-dessus, il faut, dans tous les cas, pouvoir repérer, parmi les plantes régénérées à partir du matériel végétal traité, les plantes transformées (porteuses du transgène). Pour cela, on introduit simultanément un **gène marqueur**, dit **marqueur de sélection**. C'est parmi les plantes porteuses de ce marqueur que se trouvent, avec une forte probabilité, les plantes porteuses du transgène. Les marqueurs les plus classiquement utilisés sont les résistances à un antibiotique ou à un herbicide. Après action de ces substances lors de la culture *in vitro*, seules les cellules transformées se multiplient. On ne récupère donc que des plantes transformées.

Malgré la proportion importante de cellules qui expriment les transgènes de façon transitoire, la transformation stable, résultant d'une insertion correcte de la séquence nucléotidique complète, reste un événement rare et variable selon les cellules cibles et les procédures : de l'ordre de une pour mille, voire une pour cent mille cellules traitées. Les procédés de sélection initiaux reposaient sur les gènes "marqueurs" largement utilisés chez les micro-organismes qui codent des protéines de détoxification d'antibiotiques (kanamycine,

⁶⁴ Gallais A, Ricroch A., 2006. Plantes transgéniques, faits et enjeux, éditions Quae, ISBN 2-7592-0001-9.

⁶⁵ Shou HX *et al.*, 2004. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding* **13**: 201-208.

⁶⁶ Zhu Y *et al.*, 2003. Identification of *Arabidopsis* rat mutants. *Plant Physiology* **132**: 494-505.

hygromycine ...) ou d'herbicides (cibles métaboliques présentes chez les plantes et les bactéries : eg glyphosate, phosphinothricine ...) ⁶⁷. Efficaces et pratiques ces gènes sont toujours utilisés dans les approches expérimentales. Cependant, d'une part de nombreuses voix se sont élevées contre l'utilisation de ces gènes bactériens dans les plantes cultivées, et, d'autre part il importe de disposer de marqueurs variés afin d'être en mesure d'ajouter des transgènes différents dans une même plante. Cet impératif motive deux axes d'amélioration complémentaires : la recherche de dispositifs qui permettent d'exciser les gènes marqueurs, ainsi que la diversification des procédés de sélection ⁶⁸.

La **suppression des gènes marqueurs** fait appel à deux grands types de démarches. En premier lieu, il est possible de provoquer l'intégration de la séquence marqueur en un site différent de celle du transgène agronomique, lorsque ces séquences sont insérées sur deux plasmides différents. Il est ensuite possible de ségréger ces deux séquences dans les descendances de la plante transgénique ⁶⁹. Une autre façon d'éliminer les gènes marqueurs repose sur la possibilité de les exciser de façon spécifique au moyen de nucléases. Le dispositif type combine l'action d'un gène de recombinaison bactérienne (Cre) pour cliver l'ADN aux sites spécifiques (*Lox*), initialement utilisé pour exciser du génome d'un tabac transgénique une séquence *nptII* flanquée de deux sites *lox* ⁷⁰.

4.1.3 Transgénèse chloroplastique

Une grande partie des efforts pour la création de plantes transgéniques s'est concentrée sur la transformation de l'ADN nucléaire des plantes cibles. Cependant, les cellules végétales possèdent des organites cytoplasmiques, les plastes (chloroplastes dans les feuilles) et les mitochondries, les deux étant dotés d'un génome. Les données actuelles démontrent tout l'intérêt de la transgénèse chloroplastique. En effet, au sein de la cellule végétale, chaque chloroplaste contient 10-1000 copies d'un chromosome circulaire où le transgène peut être inséré à un endroit précis (contrairement à la transformation nucléaire), représentant jusqu'à 50 000 copies du transgène par cellule, dirigeant ainsi une très forte synthèse de la protéine recombinante codée par le transgène. La transformation du chloroplaste fournit de plus une technique de confinement naturelle pour les plantes transgéniques puisque le transgène ne peut être transmis par le pollen.

⁶⁷ Potrykus I., 1990. Gene transfer to plants: assessment and perspectives. *Physiologia Plantarum* **79**: 125-134.

⁶⁸ Tuteja *et al.*, 2012. Recent advances in development of marker-free transgenic plants: Regulation and biosafety concern. *Journal of Biosciences* **37**: 167-197.

⁶⁹ Komari T, Hiei SY, Murai N, Kumashiro T., 1996. Vectors carrying two separate T-DNAs for cotransformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant Journal* **10**: 165-174.

⁷⁰ Puchta H., 2003. Marker free transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **74**: 123-134.

Les applications agronomiques sont les mêmes que pour les PGM obtenues par transformation nucléaire. Toutefois, les très forts taux d'expression observés chez les plantes transplastomiques autorisent la synthèse de molécules thérapeutiques (insuline, toxine cholérique, aprotinine, facteur de coagulation sanguin, antigènes et antibiotiques). On parle ainsi de *molecular pharming* et de *molecular farming* ou d'enzymes pour l'industrie, rivalisant ainsi avec les bactéries recombinantes, notamment en regard des coûts de production, et faisant de telles plantes de véritables **bio-usines** pour la production de molécules d'intérêt⁷¹. Ces approches bénéficieront très vraisemblablement des progrès de la biologie synthétique permettant d'identifier les gènes essentiels à la reconstitution de voies biosynthétiques complexes.

4.1.4 L'équivalence en substance

Un principe majeur (et un outil d'orientation) pour l'évaluation de la sécurité alimentaire des produits issus du génie génétique, dont les PGM, est le concept de l'équivalence en substance. Dans cette évaluation, les PGM y sont comparées avec leurs homologues des lignées parentales afin de noter des différences éventuelles, la question centrale concernant les effets involontaires (non attendus) de la transgénèse sur la santé. Dès les années 2000, les nouvelles méthodes basées sur les approches omiques ont été utilisées pour conduire une recherche globale et sans *a priori* des modifications induites dans les cultures transgéniques à différents niveaux biologiques (ARN, protéines, métabolites). Une revue récente a conclu, en accord avec des études précédentes, que les PGM pouvaient présenter, vis-à-vis des plantes sauvages correspondantes, autant de différences dans leurs profils d'expression que des plantes sauvages de la même espèce⁷². Cependant, il est clair que des plantes naturelles, même parmi les plantes cultivées, peuvent s'avérer toxiques pour l'homme (eg allergénicité). Des études récentes montrent un profond bouleversement du protéome de PGM surexprimant des protéines d'intérêt pharmaceutique, en absence de toutes altérations phénotypiques⁷³. Ceci plaide en faveur de l'utilisation des approches omiques, et non seulement des approches ciblées actuellement utilisées, pour justifier de l'équivalence en substance des PGM.

4.2 La cisgénèse

⁷¹ Scotti N *et al.*, 2012. Production of foreign proteins using plastid transformation. *Biotechnology Advances* **30**: 387–397.

⁷² Ricroch AE, Berge JB, Kuntz M., 2011. Evaluation of genetically engineered crops using transcriptomic, proteomic, and metabolomic profiling techniques. *Plant Physiology* **155**: 1752–1761.

⁷³ Bally J, Job C, Belghazi M, Job D., 2011. Metabolic adaptation in transplastomic plants massively accumulating recombinant proteins. *PLoS One* **6**: e25289.

La cisgénèse se distingue de la transgénèse par le fait qu'elle transfère artificiellement des gènes entre des organismes qui peuvent être croisés selon les méthodes d'hybridation classiques, donc entre des organismes étroitement apparentés.

En Europe cette technique est actuellement régie par les mêmes réglementations que la transgénèse, mais certains chercheurs estiment que cela devrait changer et que les variétés obtenues par cisgénèse devraient être considérées à l'égal des cultivars issus de la sélection classique des plantes. En fait, la cisgénèse induirait moins de modifications dans le génome d'un organisme que la mutagenèse aléatoire qui était largement employée avant le développement du génie génétique⁷⁴.

La cisgénèse présente l'avantage théorique sur les méthodes de sélection classiques de permettre la création de nouveaux cultivars plus rapidement et à moindre coût, et que seuls les gènes d'intérêt soient transférés. Dans les méthodes de sélection classiques, de multiples rétrocroisements doivent être réalisés, chacun demandant un temps de génération pour créer un nouveau cultivar. La cisgénèse peut en théorie atteindre le même résultat en une ou deux générations.

Une application de la cisgénèse consiste, par exemple, à créer des plants de pomme de terre résistants au mildiou en transférant les gènes de résistance dans des variétés améliorées à haut rendement⁷⁵ (cf ci-dessus) ou à créer des maïs possédant une activité phytase accrue⁷⁶. Le phytate non digéré dans le fumier animal (par exemple provenant d'une alimentation à base de maïs) est considéré comme une source majeure de pollution du phosphore dans l'environnement.

4.3 La sélection génomique

La sélection génomique ou assistée par marqueurs dérive directement de la capacité nouvelle de lire les séquences d'ADN et d'en déterminer les divers polymorphismes. De façon très schématique, dans une variété qui présente des traits particuliers (résistance à la sécheresse, résistance à certaines maladies, etc.), on recherche des séquences spécifiques dont la présence est corrélée à ces caractères dans la descendance de cette variété après

⁷⁴ Schouten HJ, Krens FA, Jacobsen E., 2006. Do cisgenic plants warrant less stringent oversight? *Nature Biotechnology* **24**: 753.

⁷⁵ Jacobsen E, Schouten HJ., 2008. Cisgenesis, a new tool for traditional plant breeding, should be exempted from the regulation on genetically modified organisms in a step by step approach. *Potato Research* **51**: 75-88.

⁷⁶ Holme IB *et al.*, 2012. Cisgenic barley with improved phytase activity. *Plant Biotechnology Journal* **10**: 237-247.

hybridation avec une variété qui ne les possède pas⁷⁷. Cet outil permet de sélectionner des caractères dits classiques (production, croissance, etc.) mais surtout des caractères plus difficiles à appréhender comme ceux liés à l'adaptation ou à la résistance. La puissance de cette méthode s'exprime d'autant plus qu'il y a une corrélation forte entre un marqueur et un caractère particulier. Elle permet alors non seulement d'éviter le système long et coûteux des expérimentations, mais aussi d'avoir un regard plus large vers d'autres populations notamment celles contenues dans des banques de semences. Et il faut redire ici l'importance de telles banques dans la satisfaction des besoins futurs.

Cette méthode alliée à de nouveaux outils de diagnostic qui autorisent le dosage d'éléments en très petite quantité dans une graine (comme la chromatographie en phase gazeuse ou liquide à haute performance) permet d'aborder la sélection de caractères non-visibles. Son emploi, qui n'altère pas le développement *in vitro* de l'embryon, autorise une sélection directe sur la graine et réduit d'autant plus le temps d'obtention d'une nouvelle variété.

4.4 Le TILLING

Le principe du TILLING (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes*) combine des méthodes de mutagenèse aléatoire avec des méthodes modernes d'analyse de l'ADN grâce à l'identification à haut débit de mutations ponctuelles (cf ci-dessus). Il s'agit d'introduire au hasard des mutations dans le génome de milliers de plantes (grâce à un produit chimique mutagène) et ensuite de repérer par une approche moléculaire les plantes renfermant les mutations recherchées dans un gène d'intérêt⁷⁸. Par dénaturation et renaturation lente, la formation d'hétéroduplexes (appariement d'un fragment sauvage avec un fragment portant une mutation ponctuelle) est générée. Une endonucléase extraite du céleri (Cel1) coupe spécifiquement les hétéroduplexes au site muté. Les fragments coupés sont enfin séparés sur gel d'acrylamide et le polymorphisme est visualisé par fluorescence. Un large éventail de variétés peut ainsi être étudié, notamment celles qui sont réfractaires à la transformation. Initialement utilisé sur *Arabidopsis thaliana*, le TILLING est utilisé sur la tomate, le melon, le pois, le colza, le blé, l'orge, la luzerne, etc⁷⁹. Son emploi vise principalement la recherche de résistances, et de qualités gustatives ou nutritionnelles⁸⁰. La technique utilisée actuellement

⁷⁷ Nakaya A, Isobe SN., 2012. Will genomic selection be a practical method for plant breeding? *Annals of Botany* **110**: 1303-1316.

⁷⁸ Bouchez D *et al.*, 2006. Les atouts de la génomique végétale : Nouvelles approches génétiques. *Biofutur* **265**: 38-44.

⁷⁹ D'Erfuth I *et al.*, 2012. A role for an endosperm-localized subtilase in the control of seed size in legumes. *New Phytologist* **196**: 738-751.

⁸⁰ Gady ALF *et al.*, 2012. Induced point mutations in the *phytoene synthase 1* gene cause differences in carotenoid content during tomato fruit ripening. *Molecular Breeding* **29**: 801-812.

pour la détection des mutations recherchée, sera, sans doute, appelée à disparaître avec l'arrivée des séquençages à haut débit et à faible coût directement sur le graine⁸¹.

Une variante du TILLING a été développée pour analyser le polymorphisme allélique : l'ecoTILLING^{62,78}. Le criblage ne se fait plus sur des populations mutagénisées avec un mutagène chimique mais sur des populations naturelles de plantes. Ainsi, on a directement accès à la variation allélique naturelle au sein d'un gène. Cette technologie a été mise en oeuvre chez *Arabidopsis thaliana*, et également chez diverses espèces telles le pois, la tomate et le blé.

5. Le développement à venir des PGM

Les perspectives d'avenir sont considérables, toutefois pondérées par la lourdeur et le coût des dossiers d'homologation qui ralentissent la commercialisation de nouvelles PGM. Plusieurs pays en développement devraient adopter à leur tour la culture des PGM avant 2015, principalement en Asie.

Alors que des dizaines de caractères génétiques sont encore en cours d'expérimentation (notamment la résistance de nombreuses plantes aux virus), les exemples suivants auront une utilisation très rapide.

La **tolérance à la sécheresse** introduite dans des plantes GM est vue comme un caractère des plus importants qui sera commercialisé dans les dix prochaines années car le manque épisodique d'eau est, de loin, la contrainte abiotique la plus importante qui limite la productivité des cultures dans le monde. Le plus avancé des maïs GM tolérants à la sécheresse a été lancé commercialement aux Etats-Unis dès 2013. Il est à noter que cette technologie a été transmise par ceux qui l'ont développée (Monsanto et BASF) à un consortium public/privé (Water Efficient Maize for Africa ou WEMA⁸², soutenu par des Fondations américaines et incluant les Instituts de recherche publics africains). WEMA espère ainsi délivrer, dès 2017, en Afrique sub-saharienne le premier maïs GM tolérant à la sécheresse où le besoin pour ce caractère est le plus grand. Une canne à sucre tolérante à la sécheresse vient d'être autorisée en Indonésie tandis que le maïs GM tolérant à la sécheresse en Chine avec un potentiel d'environ 30 Mha est un candidat potentiel. En matière d'engrais, des PGM améliorées pour l'efficacité d'absorption et de valorisation de l'azote (nitrates) sont en cours d'étude.

⁸¹ Wang TL et al., 2012. TILLING in extremis. *Plant Biotechnology Journal* **10**: 761-772.

⁸² <http://wema.aarf-africa.org/about-wema-project>.

En matière d'**intérêt nutritionnel**, sous réserve d'une autorisation réglementaire en bonne voie (malgré la destruction récente de quelques essais préparatoires à l'homologation par des opposants radicaux à toute PGM), le Riz Doré (qui produit un bêta-carotène précurseur de la vitamine A indispensable à la vision) devrait être commercialisé aux Philippines en 2013/2014. Ce riz GM peut contribuer à corriger la déficience en vitamine A, génératrice chaque année de cécité chez près d'un demi million d'enfants et du décès de plusieurs millions de personnes dont le système immunitaire est affaibli par cette carence, au sein de populations dont l'alimentation repose essentiellement sur le riz, en Asie et en Afrique notamment. Un maïs GM enrichi en un acide aminé indispensable, la lysine, est commercialisé depuis sept ans (l'albumen des grains de maïs est, en effet, pauvre en lysine), et se trouvent en développement un riz enrichi en tryptophane (autre acide aminé indispensable), un soja enrichi en protéines, des oléagineux enrichis en acides gras insaturés, etc. Des avancées sont en cours concernant des blés dont la composition du gluten est modifiée pour les rendre consommables par les personnes atteintes de maladie cœliaque (intolérance au gluten). Cette liste n'est pas limitative.

6. Conclusions

En résumé, la transgénèse est un outil puissant pour le sélectionneur, car elle donne accès à une variabilité nouvelle (résistances aux insectes, aux maladies, aux stress abiotiques, nouvelle composition chimique, ...). Cependant, si, aujourd'hui, l'outil lui-même ne semble pas poser de problème, son utilisation, en autorisant l'introduction de gènes étrangers à l'espèce considérée, entraîne des rejets de la part de la société, notamment en France.

Contrairement à leur développement au niveau mondial, la situation des PGM en Europe est très différente. Alors que les PGM correspondent aujourd'hui à plus de 12% des terres cultivées dans le monde, elles n'y représentent que 0,006% en Europe et il n'y a plus de culture de PGM en France. Cette situation a provoqué une délocalisation hors d'Europe de la plupart des recherches dans le domaine de la transgénèse végétale appliquée. Il y a donc un risque certain de perte d'expertise en Europe dont en France même si l'Europe a été pionnière dans ce domaine dans les années 1980, comme le montre le nombre d'essais effectués sur nos territoires à la fin des années 1980 et dans les années 1990. L'expérience indique en effet que sans développement industriel il ne peut pas y avoir de recherche active dans ce secteur⁸³.

⁸³ Gracien P, Le Buanec B., 2012. Académie d'agriculture de France, Séance du 05/12/2012. Le développement des plantes génétiquement modifiées (http://www.academie-agriculture.fr/detail-seance_310.html).