

Comment est fabriquée une plante génétiquement modifiée

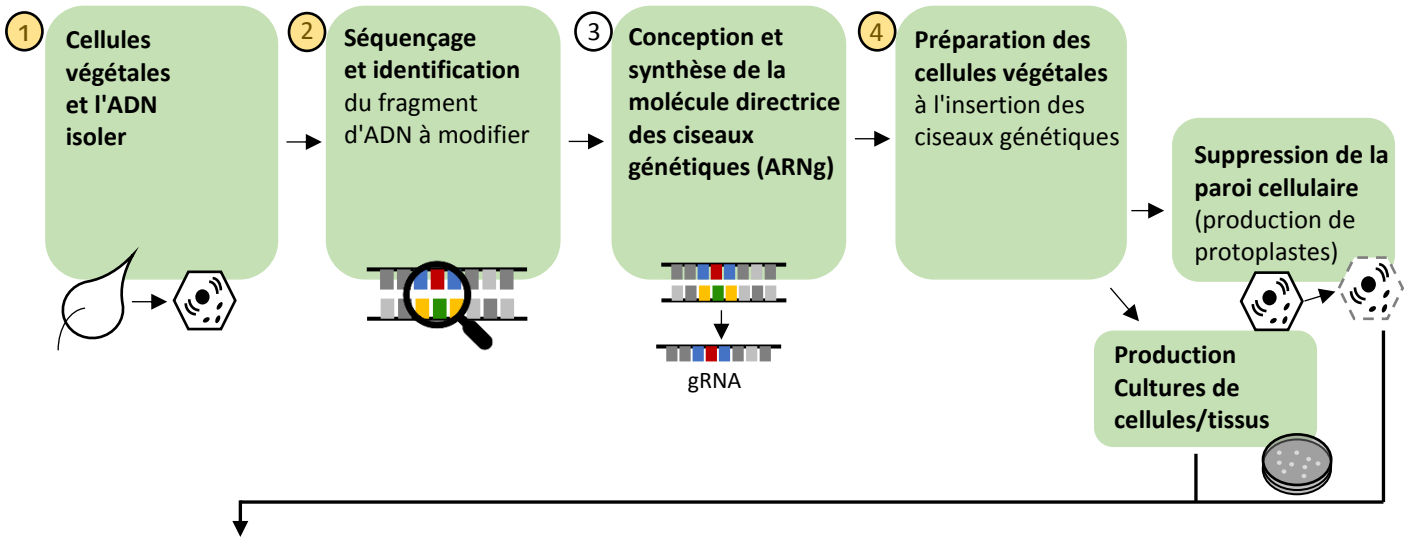


Fiche d'information

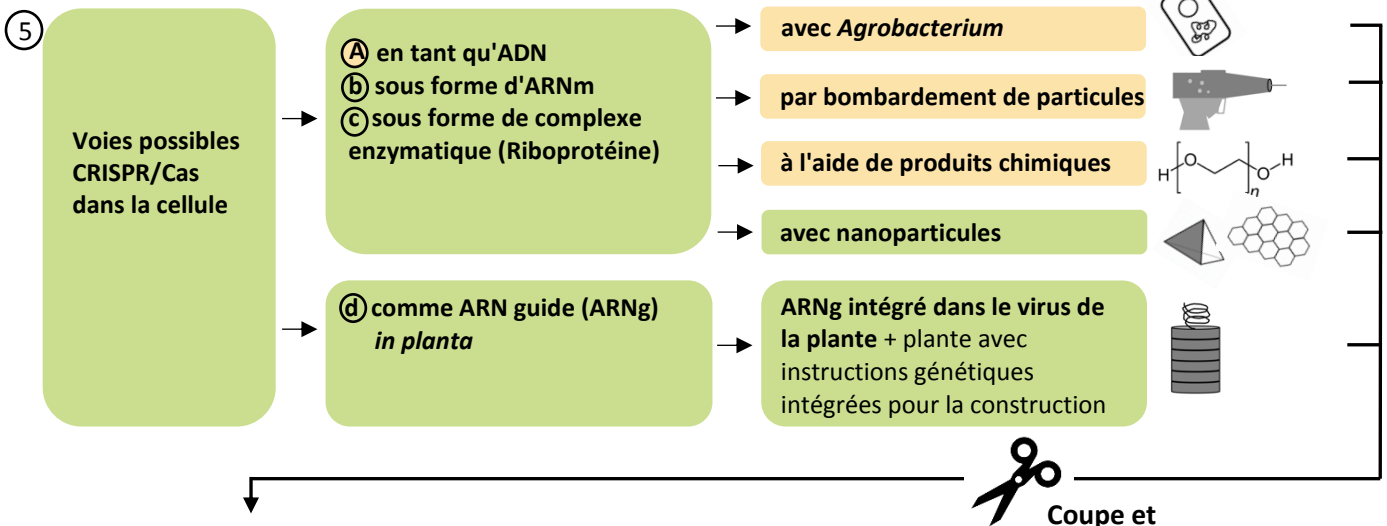
**Alliance suisse pour une agriculture
sans génie génétique**

Décembre 2022

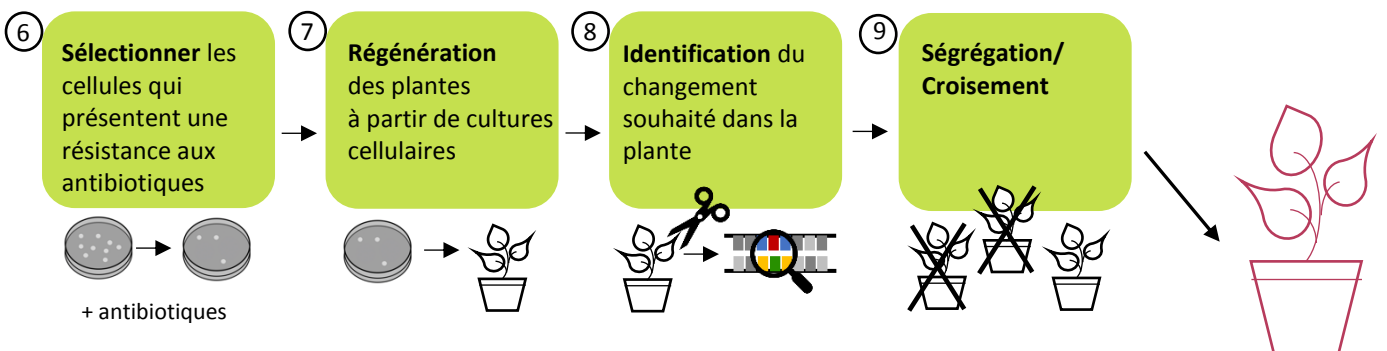
Étapes préparatoires Laboratoire et ordinateur



Introduction du ciseau génétique dans la cellule végétale



Sélection et régénération



Les étapes marquées en jaune étaient déjà utilisées dans l'ancien génie génétique (classique).

**Plante transgénique
prête à l'emploi**

Étapes préparatoires

Les étapes marquées en jaune étaient déjà utilisées dans l'ancien génie génétique (classique).

- ① **L'ADN est extrait de la plante qui doit être modifiée.**
- ② **La séquence d'ADN est déterminée** - c'est-à-dire la séquence exacte des éléments constitutifs de l'ADN.
Le gène à modifier est choisi.
- ③ **La molécule directrice correspondante (ARNg)** - le composant de reconnaissance des ciseaux génétiques - **est conçue sur ordinateur. L'ARNg est ensuite synthétisé en laboratoire** par des entreprises de biotechnologie à partir de ses éléments constitutifs.

EFFETS SECONDAIRES POSSIBLES

A cette étape, on peut déjà essayer de réduire la fréquence des erreurs involontaires par une bonne planification. La qualité de l'exécution de cette tâche dépend toutefois de nombreux facteurs : entre autres du programme informatique utilisé, des paramètres du programme et de l'expérience du chercheur qui l'utilise.

- ④ **Des cultures de cellules ou de tissus sont réalisées.**
Les ciseaux génétiques sont introduits dans des cultures de cellules ou de tissus. Pour les produire, on prélève des parties d'organes ou des morceaux de tissus (*calls*) sur les plantes et on les cultive sur un milieu nutritif.
Dans certains cas, les ciseaux génétiques ne peuvent être introduits dans la plante que si la paroi cellulaire imperméable des cellules est retirée. Les cellules végétales sans paroi ainsi obtenues (*protoplastes*) sont également cultivées dans des milieux de culture. Cette étape de production et de culture de protoplastes n'a toutefois été élaborée jusqu'à présent que pour certaines espèces de plantes utiles.

EFFETS SECONDAIRES POSSIBLES

Ces techniques peuvent laisser des "traces" au niveau de la régulation épigénétique et peuvent donc également servir d'indice d'une modification génétique, qui peut être utilisé dans le processus de détection en cas de doute.

Introduction des ciseaux génétiques dans la cellule végétale

- ⑤ Les ciseaux génétiques (complexe CRISPR/Cas) sont introduits dans la cellule végétale. Elle se compose du composant de reconnaissance (ARNg) et de l'enzyme de coupe.

Les ciseaux génétiques peuvent être introduits dans la cellule sous différentes formes :

- a. que l'ADN - c'est l'approche la plus courante.
- b. sous forme de complexe enzymatique prêt à l'emploi (produit en laboratoire)
- c. ARNm (ARN messenger : acide ribonucléique simple brin contenant le plan de construction génétique d'une protéine spécifique)
- d. comme ARN guide (ARNg)

Il existe également différentes possibilités pour le processus de mise en place :

- Si les ciseaux génétiques sont introduits sous forme d'ADN a. Les méthodes suivantes sont utilisées :

- **Vecteur (moyen de transport) :**

L'information nécessaire à la formation des ciseaux génétiques est introduite dans un ADN bactérien circulaire (**plasmide**). Le plasmide pénètre dans la cellule par le biais d'**Agrobacterium tumefaciens**. *A. tumefaciens* est une bactérie du sol qui possède naturellement la capacité de transmettre des parties de son matériel génétique aux cellules végétales.

Dans la cellule, le plasmide s'intègre dans son patrimoine génétique et transfère ainsi l'ADN qu'il contient dans le patrimoine génétique de la plante. Les informations qu'il contient sont ensuite utilisées pour former les ciseaux génétiques dans la cellule.

Comme il faut un indicateur pour identifier les cellules qui ont absorbé les ciseaux génétiques, un **gène marqueur**, généralement un **gène de résistance aux antibiotiques**, est souvent introduit avec le plasmide.

- **Biolistique :**

De minuscules particules métalliques (tungstène, or) sont recouvertes de l'ADN codant pour les ciseaux génétiques. Ces particules sont projetées à haute pression dans la cellule végétale et peuvent ainsi pénétrer dans le noyau cellulaire et l'ADN s'intégrer au patrimoine génétique.

- **Produits chimiques (polyéthylène glycol, PEG) :**

Le PEG favorise la fusion des protoplastes donneur et cible, ou de leurs noyaux cellulaires.



L'utilisation des deux derniers procédés est limitée, car ils nécessitent tous deux des protoplastes. Or, la production de ce dernier n'est pas simple et n'a pas été testée pour toutes les plantes utiles.

EFFETS SECONDAIRES POSSIBLES

Pour toutes les méthodes d'introduction sous forme d'ADN :

- **Les instructions pour les ciseaux génétiques ne sont pas supprimées.** Si les ciseaux génétiques sont introduits dans la cellule sous forme d'ADN, ils s'intègrent dans le génome : il en résulte une plante transgénique qui peut transmettre ces instructions aux cellules suivantes. L'ADN codant pour les ciseaux génétiques (ainsi que le gène marqueur introduit) doit donc être éliminé ultérieurement par croisement. Il peut néanmoins arriver qu'il soit ignoré et reste dans le génome de la plante.
- **Instructions pour les ciseaux génétiques s'intègrent de manière défectueuse :** plusieurs fois, de manière fragmentaire ou au mauvais endroit. D'autres parties du plasmide peuvent également s'intégrer par inadvertance dans le patrimoine génétique des plantes. De plus, ces interventions influencent la composition des marqueurs épigénétiques (petites molécules qui se trouvent en appendice de l'ADN et régulent l'activité des gènes). De telles modifications peuvent indiquer une intervention génétique et être utilisées dans le cadre du processus de détection en cas de doute.

Lors du tir de particules :

- **Les instructions pour les ciseaux génétiques s'intègrent dans l'ADN des organelles cellulaires :** par exemple dans l'ADN des chloroplastes responsables de la photosynthèse, qui possèdent leur propre ADN. Des morceaux d'ADN présents dans la cellule (par exemple l'ADN des chloroplastes) peuvent également être intégrés par inadvertance dans le patrimoine génétique au niveau du point de tir.

- Si le ciseau génétique est introduit sous forme de **complexe enzymatique (b.)** prêt à l'emploi et déjà synthétisé en laboratoire, on peut utiliser à cet effet **des nanoparticules, des bombardements de particules et du PEG.**



Pour cela aussi, il faut des protoplastes. Le complexe devient actif dans le cytoplasme et se dégrade après un certain temps. Il en résulte une plante GM qui ne contient plus de matériel génétique étranger.

- Si les ciseaux génétiques sont introduits sous forme d'**ARN guide (ARNg) (d.)**, cela permet certes de manipuler une plante entière, mais n'est guère utilisé. En effet, la condition à l'utilisation de ces ciseaux est que la plante soit préalablement préparée par génie génétique de manière à ce qu'elle porte déjà en elle les instructions de construction génétique pour le deuxième élément des ciseaux génétiques, pour l'enzyme de coupe. Pour l'introduction de l'ARN conducteur, on utilise des virus de plantes comme vecteurs.

EFFETS SECONDAIRES POSSIBLES

Ici aussi, on travaille avec une plante qui porte dans son patrimoine génétique les instructions pour l'enzyme de coupe des ciseaux génétiques (plante transgénique).



Coupe et modification génétique

Les ciseaux génétiques provoquent une rupture double brin à l'endroit souhaité. C'est à cet endroit que la modification génétique prévue peut être effectuée.

EFFETS SECONDAIRES POSSIBLES

Pour les différents processus de la modification génétique ("coupe") et les possibilités d'erreurs qui en découlent, voir : <https://www.youtube.com/watch?v=u1Eaoek-7w>

ainsi que

[https://fachstelle-gentechnik-umwelt.de/wp-](https://fachstelle-gentechnik-umwelt.de/wp-content/uploads/Hintergrundpapier_CRISPRCas_Erklaerung_der_Technik.pdf)

[content/uploads/Hintergrundpapier_CRISPRCas_Erklaerung_der_Technik.pdf](https://fachstelle-gentechnik-umwelt.de/wp-content/uploads/Hintergrundpapier_CRISPRCas_Erklaerung_der_Technik.pdf) (point 4)

et

https://fachstelle-gentechnik-umwelt.de/wp-content/uploads/FGU_CRISPR_Risiken2.pdf

Sélection et régénération

- ⑥ **Sont sélectionnées les plantes qui contiennent le gène marqueur, et donc probablement aussi la modification génétique.** Pour ce faire, on ajoute des antibiotiques au milieu de culture. Seules les cellules contenant le gène de résistance survivent.
- ⑦ **Une plante entière est régénérée à partir des cultures de cellules ou de tissus.** Le processus se base sur la capacité des cellules végétales à remplacer les parties perdues de la plante. L'ajout d'hormones végétales (p. ex. auxine, cytokinines) au milieu de culture permet de stimuler ce processus. Mais cette étape ne fonctionne pas encore de manière satisfaisante pour de nombreuses plantes.
- ⑧ **Identification des plantes qui portent la modification génétique souhaitée.** Pour ce faire, de l'ADN est prélevé sur les nouvelles plantes et séquencé au moyen d'un procédé PCR - c'est-à-dire que la séquence des éléments constitutifs de l'ADN est déterminée - et la séquence ainsi obtenue est comparée à la séquence de la modification prévue. Les plantes présentant la modification souhaitée sont sélectionnées. Cette étape est nécessaire, car lors des étapes précédentes, on a travaillé (dans la plupart des cas) avec des cellules/amas de cellules et non avec une plante entière. Les ciseaux génétiques n'ont pas pu être insérés dans chacune de ces cellules et la séquence cible n'a pas été modifiée comme prévu dans chaque cellule.
- ⑨ **Le gène marqueur est éliminé par croisement.** Si un gène marqueur ⑤ et/ou les instructions de construction des ciseaux génétiques ont été intégrés au début dans le génome de la plante, celui-ci est éliminé de la plante régénérée par croisement en plusieurs étapes (ségrégation).

EFFETS SECONDAIRES POSSIBLES

Malgré un dépistage et un croisement minutieux, il se peut que le gène marqueur (par exemple les gènes de résistance aux antibiotiques) ou d'autres parties du génome du vecteur bactérien (si l'un d'eux a été utilisé) persistent dans le patrimoine génétique de la plante. La probabilité de passer à côté de quelque chose augmente si le matériel génétique indésirable s'est intégré non seulement au site cible, mais aussi à d'autres sites plus éloignés du génome.