

LA MUTAGÉNÈSE EN PLEINE MUTATION ! 3^E PARTIE : LES TECHNIQUES NOUVELLES

Par Alain Cadic



LES « TRANSPOSONS » SONT RESPONSABLES DE MUTATIONS. ICI, ACTION D'UN TRANSPOSON DANS UNE INFLORESCENCE DE PELARGONIUM SP. - © A. CADIC

De nouvelles techniques de mutagénèse, issues des progrès enregistrés dans la connaissance en biologie, en physiologie et en génétique sont en cours de développement. Elles sont diverses et visent à supprimer le caractère aléatoire de la mutagénèse conventionnelle et/ou à remédier aux défauts d'origine de la transgénèse.

Depuis des centaines de millions d'années, les mutations naturelles ont conduit à la biodiversité passée et présente selon des processus divers. Depuis un siècle, des techniques de mutagénèse utilisant des substances chimiques ou des procédés physiques ont été développées, d'abord à des fins de connaissance puis pour des usages pratiques qui ont fourni des mutants utiles à l'agriculture. Cependant, le résultat des traitements effectués reste aléatoire. Il y a trente ans la mutagénèse d'insertion ou transgénèse a tenté d'y remédier ; mais la méthode soulève des difficultés d'acceptation en Europe. De nouvelles techniques apparaissent.

— L'ACCÉLÉRATION DES CONNAISSANCES ET L'AVÈNEMENT DES BIOTECHNOLOGIES —

Le milieu des années 50 se caractérise par une accélération de l'acquisition des connaissances aidée par les perfectionnements techniques et la sophistication de l'appareillage d'analyse.

Au début des années 50, B. McClintock découvre les éléments transposables en étudiant le maïs ; cette découverte ne fera pas immédiatement l'unanimité. Les éléments transposables (transposons), ou 'gènes sauteurs', comme on les a parfois désignés, sont responsables de mutations (cf. photo de *Pelargonium*).

Leur importance dans la constitution des génomes et leur rôle dans l'évolution sont l'objet de travaux intenses. Ainsi, il vient d'être établi qu'un élément transposable est responsable du caractère de floraison remontante (ou floraison continue) chez le rosier. Le caractère ridé du pois, employé par G. Mendel, est également dû à la présence d'un transposon. Y. Chupeau (2013) mentionne aussi l'architecture du maïs, la teneur en carotène des choux-fleurs orange, ou la teneur en anthocyanes des oranges sanguines.

Les autres découvertes majeures de cette époque sont celles de la structure de l'ADN (1953), du code génétique (1960), des enzymes de restriction (1965) qui permettent de couper l'ADN en des sites spécifiques, de la mutagénèse dirigée (1978), de la PCR¹ (1992), des ARN interférents (1998) qui peuvent se lier avec un ARN messager pour en bloquer la traduction en protéine, du séquençage du génome d'*Arabidopsis* (2000), suivi de celui de nombreuses autres espèces végétales comme la vigne, la pomme de terre, la tomate, le pommier... en tout 19 espèces cultivées en plus des plantes modèles.

Parallèlement, la biologie cellulaire connaît aussi un développement spectaculaire à partir des années 60 et a conduit à la mise au point de milieux de culture in vitro performants. Au-delà de la micropropagation, la technologie des protoplastes, celle des haploïdes andro et gynogénétiques (ayant pour origine les cellules destinées à la production des grains de pollen ou de sacs embryonnaires)... vont pouvoir s'épanouir.

Les conséquences vont être considérables : amélioration

¹ PCR : technique de laboratoire qui, à partir d'une quantité infime d'ADN ou d'ARN permet d'en obtenir une quantité importante par amplification enzymatique (de l'ordre du milliard de fois).

des méthodologies de mutagénèse, mise au point de la transgénèse et développement de nouvelles techniques de mutagénèse ciblée.

— DES AMÉLIORATIONS MÉTHODOLOGIQUES —

Certaines améliorations méthodologiques intéressent particulièrement les espèces à multiplication végétative dont beaucoup sont fortement hétérozygotes² et à cycle reproductif long³. Classiquement, ce sont des bulbes, tubercules, scions qui sont soumis au traitement mutagène, c'est-à-dire des bourgeons végétatifs contenant un ou plusieurs méristèmes. Dans ces structures organisées, les cibles, formées de très nombreuses cellules, subissent après traitement un réarrangement des couches ontogéniques. Le caractère aléatoire de la mutagénèse conduit à la formation de méristèmes porteurs à des degrés variables de mutations distinctes qui compliquent la sélection (chimères). Désormais, et chaque fois qu'il est possible, ce sont des organes différenciés (feuilles, tiges, racines...) qui sont traités après prélèvement sur des plantes micro-propagées *in vitro* ; après traitement, la régénération par bourgeonnement adventif ou par embryogénèse somatique est provoquée en faisant l'hypothèse que les régénérants proviendront du développement d'une seule cellule. Ceci impose, au préalable, la mise au point des techniques de culture *in vitro* (micropropagation, régénération directe ou à partir de cal...). Des essais de ce type ont été entrepris sur quelques espèces de la tribu des *Genisteae* (*Fabaceae*) comme le genêt d'Espagne, le genêt à balai et autres (Belin J. et al., 2012).

— DÉVELOPPEMENT ET ÉVOLUTIONS DE LA TRANSGÉNÈSE —

Avec le développement des connaissances et des outils liés aux biotechniques, de nouvelles méthodologies sont apparues et ont été développées à partir des années 70. La transgénèse en est actuellement la plus visible et celle qui a eu le plus de retentissement sur l'amélioration des plantes. De nombreuses publications en font état comme l'ouvrage de Gallais A. et Ricoh A., le texte de Chupeau

Y. parus en 2006 ainsi qu'à ceux de Dattée Y. et Pelletier G. parus en 2014. Depuis, la production de la première plante transgénique au début des années 80, des solutions techniques ont été proposées pour répondre à différentes critiques exprimées.

Les marqueurs de sélection les plus communs étaient des gènes de résistance aux antibiotiques ou à des herbicides et créaient un débat sur leur possible transmission dans l'environnement et les effets sur la santé. Il a été proposé de les remplacer par des marqueurs plus inoffensifs ou de s'en débarrasser après insertion de la partie utile du transgène.

Une autre voie a été choisie et proposée aux Pays-Bas, celle de la cisgénèse qui consiste à n'incorporer dans une variété que des gènes venant de la même espèce ou d'une espèce compatible en croisement. Des clones de pomme de terre, résistants au *Phytophthora* et de pommier résistants à la tavelure et issus de cette technique sont expérimentés au champ actuellement. L'intragénèse en est une forme dérivée où le gène introduit est reconstruit à partir de séquences issues d'espèces compatibles en croisement avec l'espèce à transformer. Des pommes de terre ne produisant plus d'amylose ont été obtenues par cette technique.

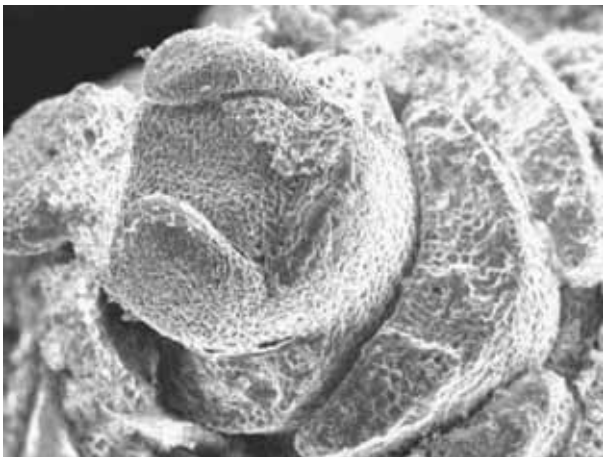
— LA MUTAGÉNÈSE CIBLÉE —

Jusqu'en 2001, la distinction entre mutagénèse et transgénèse semblait claire. La directive européenne 2001/18/EC relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement a donné des OGM (Organisme génétiquement modifié) la définition suivante : « un organisme, à l'exception des êtres humains, dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle » et mis de fait la mutagénèse et la transgénèse sur un même plan. Toutefois, il a été précisé que la réglementation sur la dissémination des plantes transgéniques ne s'appliquait pas aux mutants.

Des développements techniques nouveaux sont à l'étude pour tenter de pallier le caractère aléatoire de la mutagénèse conventionnelle. Ils posent la question de leur qualification en OGM ou non OGM et celle d'une éventuelle modification de la réglementation européenne actuelle. En 2011, la Commission Européenne a réuni un groupe d'experts européens qui a analysé ces techniques et les diverses implications qu'elles pourraient avoir en cas d'application à l'amélioration des plantes (brevetabilité, méthodes de détectations, risques...). Ces experts ont rendu leur rapport

² Une espèce est dite hétérozygote quand ses gènes sont présents sous deux formes alléliques (chez les diploïdes); il en résulte que la reproduction sexuée donne une descendance très variée où le génotype maternel est perdu.

³ Plusieurs années entre le semis et l'apparition de la première fleur (phase juvénile).



À GAUCHE, MÉRISTÈME DE *FORSYTHIA* - © SCIAM ANGERS ET, À DROITE, RÉGÉNÉRATION SUR FRAGMENT DE TIGE DE *CYTISUS SCOPARIUS* - © INRA-ANGERS

à la fin de 2011. Il en ressort que les techniques qui conduisent à l'insertion d'un matériel biochimique (mutagénèse d'insertion) relèvent de la réglementation sur la dissémination des OGM. Celles qui produisent des mutants sans insertion d'élément étranger sont exclues du champ d'application.

En même temps, le cas des porte-greffe transgéniques, porteurs de greffon non transgéniques, est également analysé et soulève des questions particulières. Doit-on considérer l'ensemble comme une plante transgénique? L'alimentation du greffon (et donc des fruits) par le porte-greffe laisse-t-elle passer des protéines venant du transgène? Si oui, quelles peuvent en être les conséquences?

— VERS UNE APPLICATION RAPIDE DES NOUVELLES TECHNIQUES —

Les mutations naturelles ont contribué à la diversité biologique animale et végétale. Pendant des millénaires,

l'homme les a utilisées sans en connaître les mécanismes d'apparition ou la nature (cf. *Jardins de France* de mars-avril 2014). La mutagénèse conventionnelle utilisant des agents physiques ou chimiques est devenue une pratique courante depuis une soixantaine d'années. Elle agit sur le génome cellulaire (noyaux et organites) sans apport exogène (cf. *Jardins de France* de mai-juin 2014). La mutation par insertion d'ADN exogène a une trentaine d'années, des améliorations sensibles ont été apportées ou sont à l'étude. Les connaissances scientifiques ont été le moteur des avancées techniques de ce domaine, en particulier depuis un peu plus de 100 ans. Les nouvelles techniques de mutagénèse (avec ou sans insertion) développées depuis moins de 15 ans devraient assez rapidement trouver des applications en amélioration des plantes.

MUTATION ET MUTAGÉNÈSE : DÉFINITIONS

Mutation: Modification brusque, héréditaire, spontanée ou induite par des procédés physiques, chimiques ou biologiques, du nombre, de la nature, de la structure ou de l'organisation des gènes dans les génomes des noyaux cellulaires ou des organites cytoplasmiques

Mutagénèse: Ensemble de méthodes de création de variabilité génétique induisant des mutations par l'emploi d'agents chimiques, physiques ou biologiques de manière aléatoire ou ciblée

À lire...

- Belin J., Le Gloanic A., Simonneau F., Cadic A., Kapusta V. (2012) Testing gamma-ray irradiation with *in vitro* culture regeneration to induce non chimeric mutants on seven taxa from the tribe *Genisteae* (*Fabaceae*). (Poster) 24 th International Symposium. Section Ornamentals «Ornamental breeding worldwide». Warsaw, Poland Sept. 2-5, 2012. (sous presse)
- Chupeau Y. (2006) Le transfert de gènes chez les plantes. Mise en perspective. *Le sélectionneur français* (57):3-24
- Chupeau Y. (2013) Le transfert de gènes : un des moteurs essentiels de l'évolution. *In Acad. Agric. France. Groupe de travail « Potentiels de la science pour l'avenir de l'agriculture, de l'alimentation et de l'environnement. »*
- Dattée Y. et Pelletier G. (Coord.) (2014) *Pourrons-nous vivre sans OGM?*. Quae Ed., 144 pages.
- Doré C. et Varoquaux F. (Coord) (2006) *Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées*. Quae Ed., 812 pages.
- Gallais A. et Ricroh A. (2006) *Plantes transgéniques. Faits et enjeux.*, Ed. Quae, 284 pages
- Gallais A. (2013) *De la domestication à la transgénèse. Évolution des outils pour l'amélioration des plantes*. Ed. Quae, 184 pages