

Compte rendu de la formation sur les nouvelles techniques de manipulation du vivant du mardi 11 octobre 2011 – pour la Confédération paysanne du Rhône

rédigé par Marie-Aude Cornu, amendé par Fabrice Laroche

Description des nouvelles techniques de manipulation du vivant et risques

Sources : Intervention de Fabrice Laroche et Brochure *Nouvelles techniques de manipulation du vivant*, Edition PEUV, octobre 2011.

Remarque : pour une meilleure compréhension, veuillez lire le compte rendu en suivant le diaporama (numéro des pages signalé de la sorte **1**)

a) Le contexte :

Les OGM ont rencontré un refus massif de la société civile ces dernières années. Cependant ce qu'on entend habituellement comme OGM ne concernaient que les organismes obtenus par transgénèse (insertion d'un ou plusieurs gènes étrangers dans l'organisme hôte). Aujourd'hui nous découvrons que d'autres plantes génétiquement manipulées se retrouvent dans les champs (tournesols obtenus par mutagenèse ou mutés) et que cette technique n'est pas nouvelle.

Au même moment un groupe d'experts européens nommés par la Commission européenne est chargé de donner son avis sur 8 nouvelles techniques, afin de savoir si elles devront au non être incluses à la réglementation sur les OGM, qui devraient être révisées en 2012, si le calendrier prévisionnel est respecté.

Nous allons voir en quoi ces techniques sont bien des techniques de manipulations du vivant et en quoi elles concernent les paysans.

b) Notions de base sur l'ADN

L'ADN (**8 ; 9 ; 10 ; 11**) est une molécule, présente dans toutes les cellules vivantes, qui renferme l'ensemble des informations nécessaires au développement et au fonctionnement d'un organisme (plan de développement des êtres vivants). L'ADN comme une encyclopédie de recettes **5**

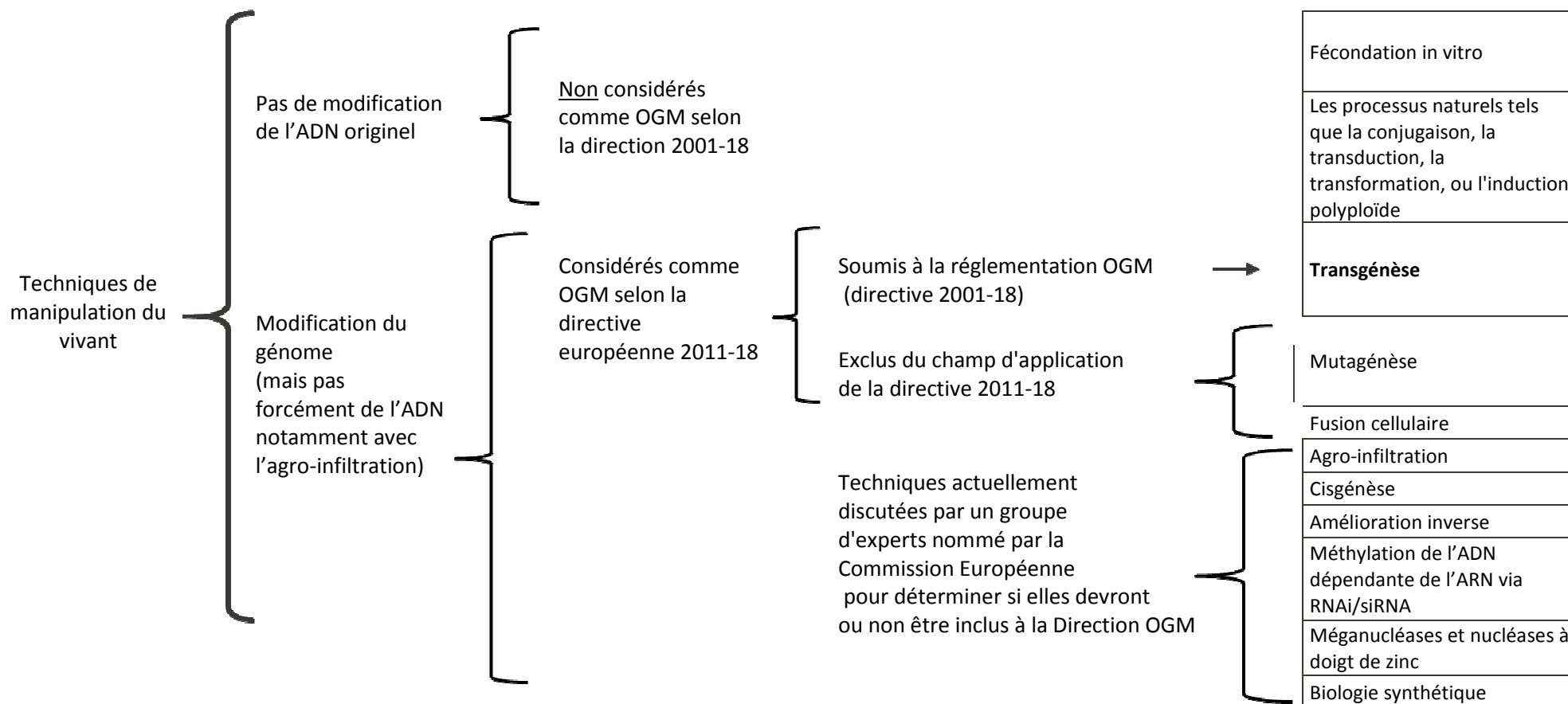
Mutation naturelle, quand on recopie l'encyclopédie de recettes, on peut faire une erreur (erreur de frappe). **13**

L'ADN : une grosse molécule en double hélice formée de 4 nucléotides A T G C (**16**). Les deux brins de l'hélice sont formés chacun par une chaîne de nucléotides. Les deux brins s'assemblent par « complémentarité » : A et T s'assemblent entre eux ; G et C s'assemblent entre eux. Ceci permet, à partir d'un brin, d'en déduire la composition du deuxième et de reformer une double hélice d'ADN. Lorsque la cellule se divise pour en donner 2. Il faut retrouver une molécule d'ADN dans chacune, d'où la nécessité de « recopier » la molécule de la cellule initiale. Les deux brins s'ouvrent, se séparent et la cellule reforme les 2 brins manquant pour reformer 2 molécules d'ADN identiques à la molécule initiale en suivant la règle de complémentarité: à chaque A un T va s'associer, à chaque G un C va s'associer. On a donc 2 cellules identiques.

Des régions de l'ADN, ou gènes, sont utilisées pour fabriquer séquences synthétisent (fabriquent) des acides aminés, qui, associés entre eux, forment des protéines.

Génome : l'ensemble du matériel génétique d'un individu ou d'une espèce codé dans son ADN

Tableau synthétique :



NB : Le génome est une information, l'ADN une molécule.

Le génome est l'ensemble de l'information génétique d'un individu. Il est codé par l'ADN chez les animaux et les plantes, et dans l'ARN chez certains virus.

L'ADN est le SUPPORT de l'information génétique chez les plantes et les animaux.

c) **L'incidence de la définition de ce qu'est un OGM sur la réglementation :**

Définition du biologiste **19**

Etre vivant (animal, végétal ou micro-organisme) dont l'homme a **modifié le patrimoine génétique**.
Définition plus large que celle de la Directive 2001-18, car elle implique seulement comme critère le fait que l'homme soit intervenu entre la cellule de base et la cellule finale.

Définition du Conseil des Communautés Européennes :

*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.***

ça exclut certaines techniques car le génome n'est pas touché (ANNEXE IA Deuxième partie):

- *la fécondation in vitro* : on fait une fécondation dans un tube à essai, on crée une cellule en laboratoire. Il n'y a pas modification du génome effectivement.
- *les processus naturels tels que la conjugaison, la transduction, la transformation, ou l'induction polyploïde*

L'induction polyploïde : prendre des cellules de plantes et les faire fusionner ensemble. (ploïdie : nombre de copies de génomes dans la cellule). La domestication a fait évoluer le blé d'un organisme à 14 chromosomes (diploïde) l'égilope à un organisme à 42 chromosomes (hexaploïde). Organisme qui est viable bien sûr. Et ça s'est fait par les voies sexuées.

Dans le cas de l'huitre triploïde, on en vient à la création d'un organisme qui contient plusieurs génomes, en les fusionnant, dans l'intention de les rendre stériles (même si finalement elles se reproduisent quand même). Modification du génome de base, qui est l'information présente dans les cellules de l'organisme : plus de chromosomes = plus d'information, mais dans ce cas on ne touche pas à la structure de la molécule d'ADN et donc on n'a pas de nouvelle information (comme dans le cas de la transgénèse ou de la mutagenèse)

Pour en savoir plus : <http://www.infogm.org/spip.php?article3767>

Les techniques qui étaient considérées comme routinières (utilisées depuis 20 ans environ) ont été exclus de la directive. Comme l'induction polyploïde, la fécondation in vitro. Par contre la mutagenèse comme elle agit vraiment sur le génome elle n'a pas pu être exclue de la définition, mais par contre du champ d'application.

Un enjeu énorme pour les paysans et la société civile, c'est d'élargir la définition.

La modification génétique se fait au moins par l'utilisation des techniques énumérées à l'annexe I A, première partie;

ANNEXE IA Première partie. Techniques considérées comme donnant naissance à un OGM

1) (...) *formation de nouvelles combinaisons de matériel génétique* : on prend deux morceaux d'ADN et qu'on les colle ensemble. OK

(...) *produit de n'importe quelle façon hors d'un organisme (...)* . l'ADN est retiré de l'organisme OK
Incorporation dans un organisme (...) où elles peuvent se multiplier de façon continue; l'ADN modifié est réintroduit, OK

2) (...) *incorporation directe dans un organisme de matériel héréditaire préparé à l'extérieur de l'organisme*. Ça fait référence à la modification des cellules qui interviennent dans la descendance. OK

3) (...) *fusion cellulaire (...)* ou *d'hybridation (aboutissant à) de nouvelles combinaisons de matériel génétique héréditaire au moyen de méthodes qui ne sont pas mises en œuvre de façon naturelle.*
Ok

Sont considérés comme OGM mais sont exclus de la réglementation :

1) *la mutagenèse*; on crée des mutations de façon aléatoire, puis on trie.

2) la fusion cellulaire (y compris la fusion de protoplastes) de cellules végétales d'organismes qui peuvent échanger du matériel génétique par des méthodes de sélection traditionnelles.

Sont considérés comme OGM et soumis à la réglementation : soumis à une autorisation de mise sur le marché, évaluation, traçabilité, étiquetage, biovigilance etc.:

➔ **La transgénèse. UNIQUEMENT**

Sont en cours de discussion au niveau européen pour savoir s'ils doivent être inclus ou non dans la directive 2001-18 :

- Cisgénèse
- Amélioration inverse
- Méthylation
- Les mutagenèses dirigées, c'est-à-dire Mutagenèses par oligonucléotides, mutagenèse par méganucléase, mutagenèse à doigt de zinc
- Porte greffe non GM / greffe GM
- Porte greffe GM / greffe non GM
- Agro-infiltration
- Biologie synthétique

d) Descriptions techniques :

Rappel sur les méthodes classiques de sélection (par voies sexuées) :

Sélection massale :

Sélection au champ des grains qui répondent à certaines caractéristiques intéressantes du point de vue du paysan. On fait une sous population d'une population. On a de la diversité.

Sélection hybride : (sur plantes allogames et non autogames)

On va choisir un individu a et on fait des lignées sur plusieurs générations à partir de cet individu pour obtenir une lignée pure et homogène. On fait ça à partir d'autres individus b, c, d etc.

Puis on croise les deux lignées pures (a et c par ex). Et là on obtient une combinaison des caractères a et c. Mais si on resème cette génération, on a le phénomène d'hétérosis, dégénérescence génétique et on n'obtient plus la même chose dans le même champ. Donc obligation de rachat des semences chaque année.

1^{ère} étape il faut extraire et purifier l'ADN, on le modifie et on le réintroduit. Tout cela se fait en laboratoire.

Rôle de l'ADN **24-27** : une plante peut fabriquer de l'amidon, de l'oxygène etc, et pour cela elle a besoin de protéines. On a deux types de protéines : les protéines de structure et les protéines fonctionnelles ou enzymatiques qui ont une activité.

L'ADN contient le plan

Une cellule : on a un cytoplasme dans lequel se trouve le noyau. Les protéines sont synthétisées (fabriquées) alors que l'ADN reste confiné dans le noyau dans le cytoplasme. On a donc un lien entre l'ADN et le cytoplasme, c'est l'ARN. C'est une molécule qui ressemble à l'ADN mais qui est plus courte et sous forme simple brin.

L'ADN a besoin d'être copié en ARN dans le noyau. L'ARN sort du noyau pour aller dans le reste de la cellule et une fois qu'il est dans le cytoplasme, où il est utilisé pour fabriquer des protéines.

Analogie culinaire : l'ADN est un recueil de recettes. Il est divisé en volumes qui sont les chromosomes. Les régions copiées en ARN sont des gènes. Ce sont les recettes de notre recueil et un ARN est la copie d'une recette. Dans l'ADN on a un ensemble de recettes, l'ARN c'est la copie d'une seule recette. La protéine c'est le plat.

- **Le but de toute modification du génome d'un organisme 30 est**

1- éteindre, 2- ajouter, 3- modifier, 4- amplifier un gène

1- éteindre : éviter la synthèse d'une enzyme impliquée dans le pourrissement (tomate flav star)

2- ajouter des gènes permettant au riz de produire de la vitamine A (riz doré); ajouter un gène pour produire un insecticide (PGM Bt)

3- modifier une protéine pour la rendre plus performante

4- insérer plus de copies d'un gène particulier pour produire plus de protéines correspondantes

Si on connaît la séquence de l'ADN, on peut la couper avec des enzymes de restriction. Elle va couper à chaque fois qu'elle va reconnaître une chaîne de nucléotides : AGGCCT... par ex.

Précision pour chercher la séquence de l'ADN

Par contre pas de précisions pour la réintroduction.

On utilise techniques de forçage : bombardement, choc électrique.

- **La mutagenèse 32 33 34** : on peut aussi traiter ces cellules, la graine ou la plante par agent chimique, rayons gamma etc. préciser Certains agents chimiques ou rayons (X, gamma, UV) peuvent interagir avec l'ADN et changer sa composition. Ces agents modifient les nucléotides (A, C, G, T, les lettres de l'ADN). La cellule possède un système de détection et de réparation des erreurs présentes dans l'ADN. Si l'ADN est trop endommagée, la réparation tient plus du bricolage et ne permet pas de restaurer la molécule initiale. Comme si on brûlait une partie de notre recueil de recettes ou que l'on écrivait au marqueur sur certaines recettes et qu'il fallait reconstruire la partie manquante aléatoirement. Le résultat sera une recette très probablement modifiée.
- **La cisgenèse 35 41** : comme de la transgenèse mais on n'insère pas un gène étranger, on insère un gène de la même espèce.
Risques similaires à la transgenèse (instabilité du fonctionnement cellulaire, dissémination dans l'environnement, modification éventuelle de la nouvelle protéine etc.)
Le promoteur ne se retrouve pas dans l'organisme final.
Insertion de gène marqueur et terminateur : peuvent être issus d'organismes étrangers.
- **Amélioration inverse** : Technique qui permet dans le cas de plantes filles hybrides de rechercher les plantes parents. Par blocage de la méiose (division cellulaire qui aboutit à la production de cellules sexuelles). C'est une technique de sélection utilisée par des obtenteurs qui veulent retrouver les lignées parentales d'un hybride d'un obtenteur concurrent. Une sorte de piratage.
- **La méthylation 36 37** : le but ce n'est pas de toucher au génome, mais de ramener un morceau en plus qui contient une partie d'un gène qui nous intéresse. Cette partie de gène a le promoteur et le terminateur qu'il faut pour exprimer un petit ARN. Ce petit ARN va pouvoir reconnaître le grand ARN, ils vont s'associer. Le résultat de ce mécanisme, c'est l'extinction du gène. On n'a pas touché l'ADN (le livre de recettes), mais le génome (on met du typex sur la recette). En fait, comme on est OBLIGÉ d'intégrer une construction qui va être utilisée par la plante pour éteindre le gène cible, IL Y A modification de la séquence d'ADN. La non-modification de l'ADN est pourtant un argument utilisé pour défendre cette technique du champ d'application et de l'appellation OGM. Pourtant IL FAUT bien intégrer la construction qui va contrôler le gène cible pour qu'elle ait un effet. Et cette construction d'intègre dans le génome, d'où modification (aléatoire) de la séquence d'ADN.

Mutagenèses dirigées :

- **Mutagenèse par oligonucléotides 54** : il s'agit d'une mutagenèse dirigée, pour insérer de manière précise dans le génome.
- Il s'agit de l'utilisation de petites séquences (quelques dizaines de nucléotides) que l'on peut commander sur internet aux entreprises qui peuvent les synthétiser de manière chimique afin de modifier exactement les nucléotides que l'on veut dans le gène qui nous intéresse. Cette modification se fait en laboratoire.
- **Les nucléases (méganucléases et nucléases à doigt de zinc) 39 40 42 43 54**, ça ne sert à modifier la séquence, ça sert à insérer à l'endroit que l'on veut. La nucléase c'est une protéine, un outil pour découper l'ADN. C'est un peu mieux maîtrisé, mais il y a une part d'aléatoire. C'est comme si on cherchait une 20aine de mots dans un livre.
Dans la cellule, on introduit la nucléase et le gène qu'on veut réintroduire, en utilisant le mécanisme de réparation de la cellule, on arrive à produire une molécule d'ADN qui contient la construction qu'on veut insérer. Il y a donc une modification.
- **Agro-infiltration** : Méthode pour faire produire des gènes à une plante. On utilise les propriétés de la bactérie *agrobacterium tumefaciens*, qui comporte dans son génome un chromosome qu'elle va pouvoir injecter dans les plantes (elle peut parasiter les plantes, induire des tumeurs). Cette bactérie s'accroche à la plante et injecte une partie de son génome à l'intérieur de la plante. On a des gènes qui codent pour une hormone de croissance qui induit une multiplication cellulaire (tumeur locale) et, on a une partie du génome qui va être réservée pour synthétiser un composé qui va être utile à la bactérie pour qu'elle se développe. On va modifier cette partie-là du génome de la bactérie en introduisant la construction que l'on veut introduire dans la plante avant de l'injecter dans la plante.
L'intérêt c'est d'utiliser la capacité de la bactérie pour lui faire produire des gènes qu'on voudrait faire exprimer dans la plante (composé pharmaceutique). (insertion d'un bouquin de recettes dans l'encyclopédie). En théorie il n'y a pas de modification de l'ADN de la plante. Par contre, comme on ajoute de l'information génétique, il y a modification du génome des cellules dans lesquelles auront été introduit l'ADN bactérien contenant la construction. Ce qui n'est pas le cas de toutes les cellules de la plante. Ce morceau d'ADN reste en général tout seul, il va servir juste une génération. Mais il peut parfois s'intégrer dans le génome de la plante ; et si c'est dans des gamètes, il va pouvoir dans ce cas être transmis aux générations suivantes.

Biologie synthétique : on recouvre sous ce terme tout ce qui consiste à créer des nouvelles cellules.

- **Les bio-briques** : on repère dans un génome les différentes fonctions des gènes (fonction 1 COUPER, fonction 2 RECONNAÎTRE TELLE SÉQUENCE D'ADN, fonction 3, 4, 5, 6 etc.). On les isole par fonction. Puis on recolle les différentes fonctions entre elles. 1-5 ; 4-6 etc. ceci afin de fabriquer de nouvelles protéines ou molécules biologiques qui auront la fonction que l'on désire créer.
- **Les cellules synthétiques** : à partir de rien, on crée une cellule. La structure et l'intérieur. Pour le moment on n'a pas encore réussi à faire cela. Craig Venter a réussi à faire une cellule minimale.
- **Greffe GM sur porte greffe non GM / Porte-greffe GM et greffe non GM**
On n'a jamais pu vérifier que le transgène circule, par contre il y a des produits du métabolisme du transgène qui circulent. (c'est le BIG MAC qui se retrouve dans un restaurant gastronomique)

Commentaire de la page 55:

On extrait l'ADN d'une plante, on sélectionne ce qui nous intéresse. On modifie l'adn, on réintroduit dans le gène.

NB : pour le biologiste, la mutagenèse regroupe TOUTES les techniques qui aboutissent à une modification du génome

- dans le cas ici de la directive, la mutagenèse ne comprend que l'utilisation d'agents chimiques et de rayons qui peuvent provoquer une modification du génome (par modification de la séquence) mais SANS EXTRAIRE l'ADN de la plante.

Les risques principaux liés à toutes ces techniques :

Risques liés à la manipulation génétique elle-même

Insertion plus ou moins hasardeuse

Instabilité génomique

Risques de dissémination dans l'environnement

Normalisation des variétés de plantes proposées sur le marché

Pour le détail des risques technique par technique, se reporter à la Brochure *Nouvelles manipulations du vivant*.

Notion d'écologie génomique : malgré les précisions apportées dans les techniques actuelles, on ne peut pas mesurer l'ensemble des perturbations provoquées, car on a une écologie génomique. On connaît encore peu de choses sur le fonctionnement de la génétique (cf nouvelles connaissances sur l'épigénétique)

Le développement de ces techniques se fait de façon exponentielle. Les généticiens et chercheurs ont même du mal à suivre l'évolution de ces techniques.

L'objectif de ces techniques, c'est **l'appropriation du vivant**.