les dossiers
d'AGROPOLIS
INTERNATIONAL
Compétences de la communauté scientifique

La plate-forme de recherches avancées Agropolis

Génomique & biotechnologie

Numéro 5

Transformation génétique *du pois d'Angole et du sorgho :* création et évaluation en champ de plantes *transgéniques résistantes aux insectes ravageurs*

Les deux projets développés avec l'ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics) *et le Cirad avaient pour objectif la lutte contre des insectes ravageurs de deux cultures importantes des régions tropicales semi-arides : une légumineuse, le pois d'Angole, et une graminée, le sorgho.*

Le sorgho est une plante alimentaire essentielle aux populations des zones tropicales semi-arides qui est particulièrement sensible aux agressions de ravageurs. Le lépidoptère *Chilo partellus*, dont le taux d'attaque atteint parfois 100 %, est l'un des plus redoutables : il détruit les tiges du sorgho qui ne parviennent plus à atteindre le stade de la floraison - et de nombreuses autres graminées.

Cet insecte foreur étant difficile à atteindre par des traitements insecticides externes puisqu'il s'abrite à l'intérieur de la plante, et aucune résistance n'étant connue dans la diversité des sorghos, l'approche transgénique paraît particulièrement adaptée pour lutter contre lui.

Le pois d'angole, cultivé dans de nombreux pays, est surtout utilisé dans l'alimentation pour sa teneur en protéines. *Helicoverpa armigera* est un insecte polyphage actif toute l'année : il provoque des dégâts très importants à la fois sur le pois d'Angole et sur le cotonnier. Or, la lutte chimique qui est utilisée de façon intensive - particulièrement sur le cotonnier - s'avère de moins en moins efficace.

L'utilisation abusive d'insecticides entraîne, outre l'élimination des ennemis naturels, l'apparition de mécanismes de résistance.

▷▷ Les chercheurs accueillis

▪ PROJET SORGHO

Nadoor Seetharama : séjour de 4 mois en France (2001) qui a permis de préparer des constructions moléculaires pour le transfert de gènes de *Bacillus thuringiensis* chez le sorgho.

Jean-Michel Vassal, Isabelle Pieretti et Monique Royer (Cirad) ont effectué une visite d'une semaine à l'ICRISAT (août 2002), prise en charge par le Cirad et l'ICRISAT.

▪ PROJET POIS D'ANGOLE

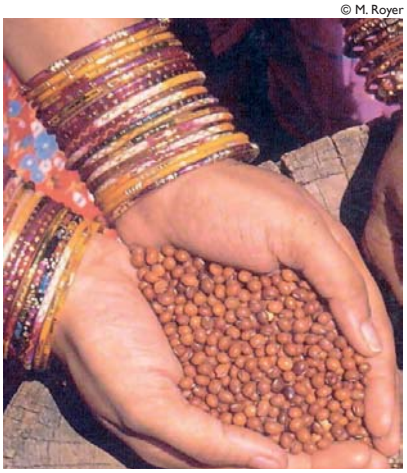
Lavanya Madakasira (ICRISAT) : séjour de 6 mois en France (septembre 2002 à févier 2003) pour construire un gène synthétique *cry2Aa* et préparer des constructions moléculaires pour la transformation génétique du pois d'Angole.

Kiran Sharma (ICRISAT) : visite de 2 semaines en France (décembre 2003) pour faire le point sur l'avancée des travaux et les perspectives du projet.

En raison de restructurations en cours à l'ICRISAT à l'époque du projet, tous les séjours prévus en France pour des chercheurs indiens n'ont pas pu se concrétiser et certaines expérimentations ont donc du être réalisées à l'ICRISAT, en Inde.

Le pois d'Angole

© M. Royer



La culture du pois d'Angole (légumineuse *Cajanus cajan*) se développe dans une cinquantaine de pays, sur le continent indien, en Asie du Sud-Est, en Afrique de l'Est (Kenya, Tanzanie, Ouganda, Malawi, etc.) ainsi que dans les Caraïbes (République Dominicaine, Puerto Rico, Guadeloupe). Le pois d'Angole est utilisé dans l'alimentation en raison de sa teneur en protéines (20-22% de protéines dans les pois ou les feuilles). Sa culture se fait souvent en alternance avec celle de céréales. On la pratique aussi en très petites parcelles, dans l'agriculture de subsistance (Cap Vert, Bénin). Le pois d'Angole est également utilisé pour réaliser des paillis, et plus récemment, comme fourrage.

La surface de pois d'Angole cultivée en Inde est supérieure à 4 millions d'ha mais cette culture subit des pertes de production importantes, liées au ravageur *Helicoverpa armigera* qui attaque les gousses.

Contact : Monique Royer, monique.royer@cirad.fr

© M. Royer

Face à ces problèmes, de nouveaux moyens de lutte se sont développés ou sont à l'étude. Ils rentrent dans le cadre de la « lutte intégrée » et ont pour objectif principal de diminuer l'utilisation des insecticides chimiques, tout en garantissant un bon contrôle des ravageurs et sauvegardant l'action régulatrice des auxiliaires parasites et prédateurs.

C'est ainsi que des variétés cotonnières transgéniques résistantes à *H. armigera* et à *Heliothis virescens* (un lépidoptère voisin de *H. armigera* présent uniquement sur le continent américain) ont été mises sur le marché dès 1996 et sont déjà cultivées aux États Unis, en Inde, en Chine, en Afrique (Burkina Faso, Afrique du Sud), en Argentine, en Australie, etc.

Des recherches ont été entreprises à l'ICRISAT sur le sorgho et le pois d'Angole pour créer et évaluer en champ des plantes génétiquement modifiées par l'insertion artificielle de gènes « insecticides » codant pour des toxines produites par la bactérie *Bacillus thuringiensis (cf. les OGM au secours des agricultures du Sud ? p.35)*.

Le lépidoptère Chilo partellus : *un foreur des tiges* du sorgho difficile *à atteindre par les* traitements insecticides *externes*

Les objectifs du « Projet sorgho » étaient la création de variétés transgéniques résistantes au lépidoptère *C. partellus* et leur évaluation en champ.

Le Cirad a mis à la disposition de l'ICRISAT l'ensemble des outils moléculaires préparés dans le cadre d'un projet européen pour la création de riz transgéniques résistants à *Chilo suppressalis* (un lépidoptère voisin de *Chilo partellus*). Ces outils permettent le transfert dans les plantes monocotylédones de quatre gènes de toxines de *B. thuringiensis : cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac et cry1B.*

Une première génération de plants de sorghos transgéniques a été •••

© M. Royer

Champ de sorgho. En vignette, détail de l'attaque du lépidoptère Chills partellus *sur un sorgho adulte.*

Le partenariat

Cirad,
Montpellier

Responsable du projet (encadrement français) :
Monique Royer, monique.royer@cirad.fr
fax : +33 (0)4 99 62 48 08

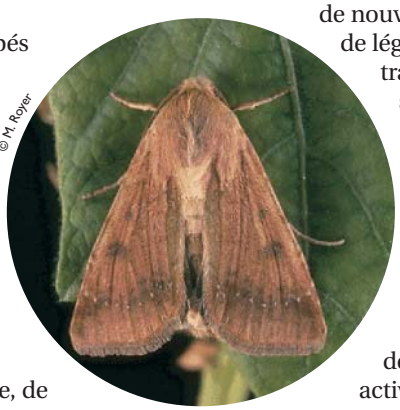
International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT)
Agri-Biotech Park, Patancheru, Inde

Responsable du projet (encadrement indien « Projet sorgho ») :
Nadoor Seetharama, n.seetharama@cgiar.org
fax : +(91) 40 2324 1239

Responsable du projet (encadrement indien « Projet pois d'Angole »)
Kiran Sharma, k.sharma@cgiar.org
fax : +(91) 40 2324 1239

obtenue par la technique de bombardement de microparticules en utilisant une construction dans laquelle le gène *cry1Ac* est sous le contrôle d'un promoteur « inductible par blessure » : ce promoteur induit donc l'expression du gène uniquement en cas d'attaque de la plante par l'insecte, ce qui permet de réduire la production de toxine. Ces plants qui ont déjà été transférés en serre sont résistants à *Chilo partellus*.

Une seconde génération de sorghos transgéniques a été obtenue par la technique (transgénèse) de transformation génétique via la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* en utilisant les outils moléculaires développés au Cirad. Dans ces outils, les gènes synthétiques de toxine de *B. thuringiensis* *cry1Aa* et *cry1B* sont sous le contrôle d'un promoteur « constitutif » (qui induit l'expression du gène dans tous les tissus de la plante et ce, de façon continue dans le temps) ou d'un promoteur « inductible par blessure ». Les plants présentant une résistance à *C. partellus* ont été caractérisés au niveau moléculaire (analyse de l'ADN et dosage de la quantité de toxine). La génération T3 de ces plants est en cours d'évaluation en serre.


© M. Royer

Le lépidoptère Helicoverpa armigera : *un insecte nuisible du* pois d'Angole polyphage *et actif toute l'année*

L'objectif principal du « Projet pois d'Angole » était le développement de nouvelles variétés de légumineuses transgéniques qui soient résistantes au lépidoptère *H. armigera*.

Des travaux réalisés au Cirad ont permis d'identifier quatre toxines de *B. thuringiensis* actives sur *H. armigera* : *Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac et Cry2Aa*. De plus, l'étude des sites récepteurs de ces toxines chez les larves de *H. armigera* a permis de reconnaître le comportement spécifique de la toxine *Cry2Aa* et de retenir la combinaison *[Cry1Ac + Cry2Aa]* comme la plus prometteuse pour retarder ou réduire les risques d'apparition d'une résistance.

Une première génération de constructions moléculaires a été préparée au Cirad. Elle permet le transfert *via Agrobacterium tumefaciens* des gènes *cry1Aa*, *cry1Ab* et *cry1Ac* sous le contrôle de promoteurs spécifiques (promoteur du gène 35S du virus CaMV ou du gène EF1-α de *Arabidopsis thaliana*). Ces constructions ont été apportées à l'ICRISAT et différents plants de pois d'Angole exprimant les toxines de *B. thuringiensis* ont été obtenus en génération T0, T1 puis T2. Ces plants transgéniques, qui ont été transférés en serre, ont été évalués pour leur résistance à *H. armigera* et ont été caractérisés au niveau moléculaire (analyse de l'ADN et dosage de la quantité de toxine).

Un nouveau gène synthétique codant pour la toxine *Cry2Aa* a également été préparé au Cirad, de même qu'une seconde génération de constructions permettant le transfert de ce gène en combinaison avec *cry1Ac*.

Le sorgho

Le sorgho, utilisé à plus de 55% pour l'alimentation humaine (plus de 600 millions de personnes en dépendent) est la cinquième culture céréalière mondiale. Il couvre environ 44 millions d'ha dans une centaine de pays. Les principaux producteurs de sorgho sont les États-Unis, l'Inde, le Nigeria, le Mexique.

Cependant, il constitue aussi une culture vivrière essentielle pour des millions d'agriculteurs pauvres des tropiques semi-arides, la plante étant moins exigeante en eau que les autres céréales, en Afrique - où sa culture couvre près de 14% des terres arables - et en Asie. L'importance du sorgho s'est encore accrue au cours des dernières décades, avec l'exploitation du fourrage (récolté vert avant la maturation des grains ou sec).

La surface consacrée au sorgho en Inde est de 9,2 millions d'ha, dont 5 millions pendant la saison pluvieuse contre 4,2 millions pendant la saison sèche. Le sorgho est attaqué par plus de 150 espèces d'insectes, parmi lesquels le foreur de tiges *Chilo partellus* qui non seulement réduit le rendement des grains mais limite également la qualité du fourrage.

▲ *Adulte femelle* Helicoverpa armigera, *insecte nuisible du pois d'Angole*

▼ *Champ de sorgho*

© M. Royer

© M. Royer

Culture in vitro *du pois d'Angole*

Les OGM au secours des agricultures du Sud ?

Il existe aujourd'hui deux catégories d'OGM (Organismes Génétiquement Modifiés) cultivés : ceux dans lesquels on a introduit un gène qui confère à la plante une résistance à un herbicide et ceux dans lesquels on a introduit un ou plusieurs gènes de résistance à certains insectes (quelques-uns portent encore les deux types de gènes). Dans les deux cas, ces OGM sont sans intérêt pour le consommateur.

Dans le premier cas, le contexte est celui d'une grosse multinationale à qui les OGM permettent de vendre beaucoup d'herbicide. Les agriculteurs pauvres du Sud pratiquent quant à eux un désherbage manuel et la suppression de ces pratiques ne semble ni socialement, ni économiquement désirable pour les gouvernements concernés.

Il en est autrement pour les OGM résistants aux insectes. À titre d'exemple, les pays qui cultivent déjà le coton transgénique en Afrique, en Amérique latine et en Asie constatent une réduction très forte des quantités de pesticides utilisées par les petits producteurs, souvent d'ailleurs avec des précautions minimum, et donc des gains non négligeables, économiques et sanitaires, pour ces utilisateurs. Mais là encore, les plus gros bénéficiaires sont les multinationales qui produisent les semences résistantes. Et pour les consommateurs, le coton transgénique n'est pas plus doux au toucher ni moins cher que le coton issu de plantes non transformées.

Le dernier rapport de l'ISAAA (*International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications*, www.isaaa.org) montre que si les OGM ne concernent aujourd'hui que deux caractères, ils n'intéressent aussi que quatre plantes (soja, maïs, coton et colza) ; ce rapport souligne également que près de 80 % de ces OGM sont plantés dans seulement cinq pays : États-Unis, Argentine, Canada, Brésil et Chine. Force est donc de constater que les OGM produits jusqu'ici par les multinationales ne profitent guère aux pauvres du Sud.

Les opposants aux OGM, d'un côté, mais aussi les instigateurs de campagnes pro-OGM, de l'autre, (citons notamment les campagnes menées par des gouvernements surtout soucieux d'écouler leurs surplus agricoles pour convaincre l'opinion de la valeur des OGM contre faim et pauvreté) ont donc tous de bonnes raisons de critiquer les débats actuels.

Mais que faut-il penser des recherches en cours qui visent à produire des variétés OGM :

- par une recherche restant 100% dans le secteur public et produisant de ce fait des biens publics internationaux ?
- par une recherche qui utilise des gènes et des technologies libres de droit *(open source technologies)* ?
- en transférant exclusivement des gènes de plante à plante (et non de micro-organisme ou d'animal à plante) et souvent entre plantes très proches ?
- concernant des plantes qui sont à la base de l'alimentation des plus pauvres ?
- pour des caractères qui sont les principaux facteurs limitant des productions agricoles dans les zones agroécologiques marginales où se concentrent les agricultures pauvres ?
- pour des caractères nutritionnels, visant ainsi à améliorer la santé des plus démunis ?
- quand, et seulement quand les voies de sélection conventionnelles ont échoué, sont impossibles (à cause, par exemple, du mode de reproduction particulier de la plante) ou très difficiles du fait de la nature ou de l'origine du caractère désirable ?
- ayant passé avec succès tous les tests de biosécurité (pour l'environnement et la santé) selon les standards internationaux en vigueur ?

De nombreuses équipes de recherche du secteur public travaillent aujourd'hui dans cette voie (elles sont malheureusement très peu nombreuses en France) pour aboutir demain à des OGM utiles pour les agriculteurs et/ou les consommateurs qui ont le plus besoin d'innovation.

Contact : Yves Savidan, yves.savidan@agropolis.fr

Nota : l'opinion exprimée ici n'engage que son auteur et ne représente en aucun cas une position institutionnelle.

Les travaux de transformation génétique du pois d'Angole avec cette seconde génération de constructions étaient programmés à l'ICRISAT pour 2006.

Conclusions et perspectives

La coopération entre la France et l'ICRISAT est à bénéfices partagés. Les institutions françaises ont bénéficié de l'accès au laboratoire de culture *in vitro* de l'ICRISAT et ont pu également tester leurs stratégies de recherche sur des plantes originales. Les chercheurs indiens de l'ICRISAT (et à travers eux, la communauté internationale qu'ils servent) disposent aujourd'hui de plants transgéniques de sorgho et de pois d'Angole, qui ont été transférés en champ courant 2003, pour initier un cycle d'évaluations (incluant des tests de biosécurité) et de transferts des résistances acquises dans différentes variétés, cycle qui prendra plusieurs années.

Les chercheurs de l'ICRISAT [1] espèrent obtenir à terme des variétés de sorgho et de pois d'Angole résistantes aux insectes qui soient utilisables par les agriculteurs.

Cet ultime objectif risque d'être difficile à atteindre à cause (i) des nombreux tests toxicologiques que la réglementation impose pour la commercialisation des nouvelles variétés de plantes transgéniques (*deregulation* en anglais) et (ii) des nombreux brevets détenus par des multinationales sur l'utilisation des gènes de toxines de *B. thuringiensis* et sur l'utilisation des techniques de transgénèse. ■

1 On ne présente ici, malheureusement, aucune perspective pour la collaboration entre le Cirad et l'ICRISAT puisque l'équipe française concernée ne travaille plus sur cette thématique. Les perspectives concernent donc uniquement les travaux réalisés à l'ICRISAT.

▷▷ Publications

Projet sorgho

Girijashankar V., Sharma H.C., Sharma K.K., Swathisree V., Prasad L.S., Bhat B.V., Royer M., San Secundo B., Narasu M.L., Altosaar I., and Seetharama N., 2005. Development of Transgenic Sorghum for Insect Resistance against the Spotted Stem Borer *(Chilo partellus)*. Plant cell reports 24 : 513-522.

Projet pois d'Angole

Lavanya M., Uraichen S., Pieretti I., Vassal J.-M., Sharma K.K. et Royer M., 2003. Genetic transformation of pigeonpea to evaluate insecticidal genes for resistance to the legume pod borer, *Helicoverpa armigera*. Poster présenté au 7ème congrès international de biologie moléculaire des plantes (Barcelone, 23-28 juin 2003).