

# Comment obtenir une plante génétiquement modifiée ?

**MT 21349**



*DVD scientifique à usage pédagogique de 20 minutes environ.*

## **Objectifs :**

- Comprendre ce que représente une plante transgénique,
- Montrer les principales techniques permettant d'obtenir une plante transgénique.

## **Programme de 1<sup>ère</sup> L et ES**

- Du génotype au phénotype, applications biotechnologiques.
- La relation entre ADN et protéines.

## **Programme de 1<sup>ère</sup> S**

**La morphogenèse végétale et l'établissement du phénotype.**

### CONTENU DU FILM

#### **Séquence 1 : introduction : il s'agit de poser le problème.**

Après une très longue période, d'une dizaine de millénaires, durant laquelle la sélection et l'amélioration des plantes se sont faites essentiellement de façon empirique, ces démarches sont devenues scientifiques à la fin du siècle dernier avec, notamment, la découverte des lois de la génétique.

L'agronome fit alors appel aux techniques d'hybridation, c'est à dire qu'il est parti d'un croisement entre deux individus présentant des avantages agronomiques complémentaires et dont il veut retrouver les qualités associées chez un même individu de la descendance.

Ces croisements peuvent être contrôlés par la castration des étamines de l'une des plantes et l'apport manuel de pollen de l'autre plante et ceci à l'aide d'un simple pinceau. On obtient ainsi des graines hybrides qui contiennent la moitié des gènes de la plante mère, c'est à dire de la plante castrée, et l'autre moitié des gènes provenant de la plante-père c'est à dire celle ayant fourni le pollen.

Cette méthode classique est encore actuellement très utilisée mais on peut également obtenir aujourd'hui des nouvelles plantes en ayant recours à des procédés de génie génétique. Il s'agit alors de prélever directement l'un des gènes présentant un grand intérêt pour l'agronome chez l'une des plantes puis de l'insérer directement dans le génome d'une autre plante. Ce travail est réalisé dans des laboratoires spécialisés en biologie moléculaire et en génie génétique dans lesquels sont réalisés toutes les opérations de transfert ; laboratoires pourvus de serres spécialement construites à cet effet.

Nous allons voir les différentes étapes et différentes variantes dans les modalités de transfert de gènes qui conduisent à la réalisation de plantes génétiquement modifiées encore couramment appelées OGM.

**Durée : 40 secondes**

# Partie 1 : Isolement et identification des gènes

## Séquence 2 : isolement du gène.

Pour réaliser une telle plante génétiquement modifiée, la première opération consiste à rechercher et identifier le gène qui intéresse l'agronome au sein du génome de l'organisme donneur et ceci parmi les milliers d'autres gènes que possède cet organisme. Ce dernier peut être une autre plante mais également une bactérie, une levure ou même un animal. La recherche de ce gène se fera au sein d'une banque de gènes.

Cette banque se présente sous la forme d'une population de bactéries, d'*Escherichia coli* par exemple, contenue dans une simple boîte de Pétri. Ces bactéries renferment, chacune, un petit fragment du génome de l'organisme donneur. Pour construire cette banque, il faut prélever la totalité du génome des cellules donneuses, couper ce génome constitué de longues molécules d'ADN par des enzymes dites de restriction. Les fragments ainsi générés sont de taille variable toujours assez grands pour contenir chacun un ou plusieurs gènes mais de taille suffisamment petite pour pouvoir s'intégrer dans un plasmide bactérien. Ces derniers sont des petites structures circulaires d'ADN à l'écart de l'ADN chromosomique.

A cet effet et en parallèle, l'expérimentateur extrait les plasmides portés par une colonie de bactéries et procède à l'ouverture de ces plasmides par les mêmes enzymes de restriction. Plasmides ouverts et fragments du génome de la cellule donneuse sont mélangés en présence d'une ligase ou enzyme de ligation.

Chaque fragment d'ADN génomique est inséré dans un plasmide individuel et les plasmides sont ensuite réintroduits dans les bactéries. Ces bactéries ayant intégré tous les fragments du génome de la cellule donneuse sont mises en culture pour donner naissance chacune à un clone.

L'ensemble de ces clones constitue la banque dite " banque génomique ". L'opération suivante consiste à rechercher, au sein de la banque, le clone issu de la bactérie qui a hérité du gène recherché. Deux cas peuvent se présenter : ou bien on connaît déjà chez un organisme appartenant à un autre groupe, un gène ayant la même fonction que celui recherché et alors une copie complémentaire de ce gène servira de " sonde " pour aller à la « pêche » du gène recherché ; ou bien on ne sait rien de ce gène et l'on pourra alors recourir à une méthode indirecte appelée " complémentation fonctionnelle " chez des levures.

Cette dernière technique consiste à rechercher dans une population de levures mutantes, toutes déficientes pour la fonction du gène recherché, celle qui aura, au hasard, eu la chance de récupérer le fragment d'ADN contenant le bon gène et qui, par conséquent, se trouvera guérie de son handicap. Cette levure, redevenue de phénotype sauvage, sera isolée, puis mise en culture pour constituer un clone de taille suffisante pour que l'expérimentateur puisse disposer de quelques milliers de copies du même gène.

**Durée : 1 minute et 25 secondes**

## Séquence 3 : identification du gène.

Les fragments d'ADN contenant le gène peuvent être visualisés sur gel d'agarose. Cette technique est couramment utilisée en biologie moléculaire. Elle consiste à faire migrer, grâce à un courant électrique, différents fragments d'ADN déposés dans des puits creusés en bordure d'un gel.

On coule un gel qui est liquide lorsqu'il est légèrement chauffé mais qui se solidifie dès que sa température baisse de quelques degrés lorsqu'il est versé dans un petit moule. On réalise sur l'un des bords une série de puits à l'aide d'une sorte de long peigne. Le gel est ensuite démoulé et placé dans la cuve de l'appareil à électrophorèse, cuve dans laquelle on a, au préalable, versé un tampon électrolyte. On dépose, à l'aide d'une micropipette, la solution d'ADN à analyser dans chacun des puits, chaque puits correspondant à une solution d'ADN d'un échantillon (une plante par puits, par exemple) on ferme à l'aide d'un couvercle par mesure de sécurité. On met le générateur sous tension, ici une centaine de volts en courant continu.

Au bout de quelques minutes, on peut constater que le contenu des puits a commencé à migrer. A la fin du temps de migration, généralement 20 à 30 minutes plus tard, le gel est placé sur une table à illumination UV et les bandes d'ADN, qui ont migré selon leur taille, sont repérables à leur fluorescence en rose. Un des puits a été réservé à un mélange de fragments de masses moléculaires connues qui vont servir de témoin. Il est en effet possible, par comparaison des niveaux de migration de ces témoins de déterminer la masse et donc la taille exprimée en nombre de paires de base, des fragments à étudier.

Dans le cas où l'on connaît un gène ayant la même fonction chez un autre organisme, on dispose alors, en utilisant une copie complémentaire de ce gène que l'on marque à l'aide d'un radiotracteur, d'une sonde radioactive capable de reconnaître la molécule d'ADN à identifier en s'hybridant même partiellement avec elle. Pour réaliser cette hybridation moléculaire, il faut au préalable transférer les fragments d'ADN du gel sur une membrane de nitrocellulose.

Ce transfert peut se faire par capillarité ou avec un appareil à hybrider qui utilise l'aspiration d'une pompe à vide pour transférer l'ADN du gel vers le filtre de nitrocellulose. Une feuille de plastique bien étanche grâce à la présence d'un couvercle ajusté permet à une pompe de créer un vide, contrôlé grâce à un manomètre. Ce vide assure le transfert de l'ADN du gel sur la membrane de nitrocellulose. On peut séparer alors le gel de la membrane de nitrocellulose qui en est devenu une fidèle réplique. L'opération suivante consiste à mettre en contact la sonde radioactive avec les bandes d'ADN transférés sur la membrane de nitrocellulose de façon à réaliser l'hybridation dans le cas où la sonde et l'une des bandes présentent des séquences complémentaires.

La membrane de nitrocellulose est placée au contact d'une solution tampon contenant la sonde radioactive dans un four à hybrider qui maintient une température constante - ici 68°C- et assure, grâce à une rotation permanente des tubes, un bon contact entre la sonde radioactive et la membrane de nitrocellulose. Les molécules de la sonde radioactives vont reconnaître les molécules d'ADN fixées sur la membrane de nitrocellulose dès qu'elles leur sont complémentaires sur le plan de la séquence. Cette membrane de nitrocellulose est ensuite mise au contact d'une pellicule photographique du type de celle utilisée par le radiologue. Après quelques jours de contact au froid et à l'obscurité, la plaque photographique est révélée, puis fixée et il est alors possible de reconnaître les bandes dont l'ADN s'est hybridée avec la sonde.

Une fois que le fragment d'ADN portant le gène recherché est identifié, il convient d'en connaître la séquence précise et on a pour cela recours à un séquenceur d'ADN. La méthode utilisée est celle dite des " didésoxy de Sanger " qui repose sur la séparation des deux chaînes de la molécules d'ADN suivie de la synthèse de fragments dont la croissance est bloquée à différents niveaux par l'introduction de didésoxy, eux mêmes liés à un fluorochrome. Aujourd'hui ce travail est réalisé par un séquenceur automatique. Les fragments néo-synthétisés sont ensuite séparés et classés en longueurs croissantes par une chromatographie capillaire.

A mesure que les fragments sortent du tube capillaire, un laser repère la couleur du fluorochrome : l'ordre de sortie des fragments du tube capillaire donne l'ordre de succession des bases de l'ADN analysé c'est à dire la séquence du gène. Pour un fragment d'ADN dont on veut déterminer la séquence nucléotidique, après passage par une étape de néosynthèse de fragments de longueurs variables, par PCR en présence des " dydésoxy ", ce mélange de fragments va être trié, classé et le fluorochrome identifié par le séquenceur automatique. Pour cela, la population moléculaire sera récupérée en solution tampon dans un tube Ependorff. Le contenu du tube est déposé dans l'un des puits d'une plaque, elle-même placée à l'intérieur du séquenceur. Le séquenceur va prélever le contenu du puits et l'injecter dans un petit tube capillaire.

L'opérateur referme alors l'appareil car la détermination de la couleur du fluorochrome par le laser ne peut se faire qu'en chambre noire. Après migration dans le capillaire, les fragments classés selon leur vitesse de migration, elle même directement liée à la taille de ces fragments, sont identifiés en sortie de tube par le faisceau laser situé derrière une petite porte noire. La couleur du fluorochrome qui termine chaque fragment est identifiée par le faisceau laser. L'information ainsi recueillie est dirigée vers un ordinateur qui à chaque couleur attribue la lettre symbole de chacune des bases de l'ADN. Ainsi s'établit au fur et à mesure la séquence exacte de l'ADN c'est à dire du gène recherché.

Nous voyons sur l'écran de l'ordinateur à la fois les pics enregistrés pour chacune des quatre couleurs et, en regard, les bases correspondantes identifiées, ainsi qu'une partie de la séquence du gène recherché, à la fois sous forme de pics de couleur et, en regard, l'enchaînement successif des bases.

## Partie 2 : Transfert d'un gène dans une plante

Durée : 5 minutes et 30 secondes

### Séquence 4 : avec agrobacterium ou technique dite de transfert indirect.

Une fois le gène d'intérêt isolé et séquencé, l'opération suivante consiste à l'introduire dans des cellules végétales afin de modifier le génome de ces cellules, puis à régénérer à partir de ces cellules génétiquement transformées, des plantes capables d'exprimer ce gène et de le transmettre à sa descendance.

Pour cela, toutes les cellules qui possèdent ce pouvoir de régénération peuvent être utilisées telles les cellules du parenchyme foliaire.

Il existe plusieurs techniques de transformation. La plus fréquemment utilisée est la technique dite indirecte qui fait appel à des bactéries qui vivent normalement dans le sol ; on les appelle les agrobactéries, mais qui sont également capables de s'attaquer à un certain nombre de plantes pour y provoquer une maladie, sorte de tumeur de nature cancéreuse, que l'on appelle la " galle du collet ".

Rappelons que le collet est la zone de jonction entre la racine et la tige, généralement située au niveau de la surface du sol. Les agrobactéries se présentent sous la forme de petits bâtonnets gram-négatifs. On sait aujourd'hui rendre ces bactéries inoffensives tout en leur conservant leur remarquable capacité à inoculer une partie de leur information génétique dans les cellules de la plante. Elles s'attaquent d'autant plus vite et plus fortement à la plante que celle-ci est blessée. Ces bactéries désarmées sont utilisées comme vecteurs de transformation sous réserve qu'on leur greffe, à la place des oncogènes que l'on a retirés, le gène à transférer.

Cette opération nécessite une souche préalable de bactéries dont on possède une très grande maîtrise de la génétique, telle qu'*Echerichia coli*, qui renferme, dans l'un de ses plasmides, le gène d'intérêt. Ces bactéries se multiplient aisément et peuvent transférer leur plasmide aux agrobactéries par conjugaison. Celles ci vont, à leur tour, transférer l'information contenue dans leurs plasmides aux cellules végétales.

Cette opération de transfert est réalisée en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. Les agrobactéries, conservées au froid sont mises en suspension dans un milieu de culture dans le fond d'une boîte de Pétri stérile. C'est dans cette boîte de Pétri que va être réalisée la coculture agrobactéries/fragments de végétaux. Les fragments de végétaux, ici des feuilles de tabac qui ont été au préalable stérilisées par trempage durant une quinzaine de minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium dilué.

Ces feuilles sont ensuite rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile puis déposées dans une boîte de Pétri stérile pour y être découpées en petits fragments.

On peut aussi calibrer les fragments de feuilles en découpant dans le parenchyme des rondelles grâce à l'utilisation d'un emporte-pièce stérile. Ces rondelles, appelées " disques foliaires " qui présentent en périphérie une zone de blessure, sont mises à flotter sur la suspension d'agrobactéries. Celles-ci vont envahir les disques ainsi découpés en partant des cellules périphériques blessées et de leurs voisines et y introduire leurs plasmides porteurs du gène à transférer.

Après 20 minutes de contact environ, les disques foliaires sont prélevés puis rincés à l'eau distillée stérile. Cette opération de rinçage est répétée trois fois. A l'issue de ces rinçages, les disques foliaires sont mis en culture sur un milieu nutritif gélosé. Ici, il s'agit du milieu de M.S. (Murashigue et Skoog) additionné de vitamines et d'hormones. Cinq disques sont, en moyenne, déposés par boîte de Pétri, ceci afin qu'ils puissent donner éventuellement lieu à des régénérations et se développer sans autres pressions de sélection que celles imposées par l'expérimentateur.

Cette coculture des disques foliaires et des agrobactéries se poursuit à l'obscurité durant une nuit. A l'issue de cette période, les disques foliaires sont transférés sur un nouveau milieu de culture dans lequel a été ajouté un antibiotique ; ici, comme c'est assez fréquemment le cas, il s'agit de la kanamycine.

Cet antibiotique a pour but de sélectionner uniquement les cellules ayant acquis, avec le gène d'intérêt, un second gène qui lui est lié et qui leur confère une résistance c'est à dire une protection vis-à-vis de cet antibiotique. Les autres cellules, c'est-à-dire celles qui n'ont pas été transformées par les agrobactéries, vont être rapidement détruites.

**Durée : 2 minutes et 20 secondes**

### **Séquence 5 : autres techniques directes.**

Ces techniques de transformation indirectes par l'intermédiaire des agrobactéries, ne sont pas applicables à toutes les plantes et en particulier pas aux Monocotylédones comme les graminées.

On doit alors avoir recours à d'autres techniques comme celles dites de transformation directe c'est à dire ne nécessitant pas le recours à un organisme vivant. Ces méthodes de transformation directe impliquent très souvent l'utilisation, non pas de tissus ni même de cellules isolées, mais de protoplastes c'est à dire de cellules débarrassées de leur paroi pectocellulosique.

Pour obtenir ces protoplastes végétaux, on prélève des fragments de limbe sur des feuilles que l'on fait macérer dans une solution de pectinase pour séparer les cellules puis dans une solution de cellulase qui a pour rôle de digérer les parois cellulosiques. On ajoute dans ce dernier milieu une solution à 13% de mannitol, ceci afin de maintenir artificiellement la pression normalement exercée par la paroi, maintenant disparue. Sans cette pression osmotique du mannitol, la cellule éclaterait sous l'effet de la pression interne exercée par l'appareil vacuolaire. La paroi en cellulose disparaît totalement et le protoplaste est ainsi libéré dans le milieu hypertonique. Ce sont ces protoplastes qui vont être utilisés pour l'obtention de plantes génétiquement transformées par les méthodes directes. On voit donc une boîte de Pétri renfermant un milieu de culture au sein duquel se trouvent dispersés des protoplastes de parenchyme foliaire.

Au microscope, ces protoplastes apparaissent sphériques, fortement chlorophylliens, libres et mobiles avec, au centre, une grande vacuole qui repousse en périphérie le noyau, masqué par un amas de chloroplastes. Il arrive que ces suspensions de protoplastes apparaissent plus hétérogènes. Cette hétérogénéité peut provenir de cellules provenant de plusieurs tissus. Le protoplaste qui paraît dépourvu de chloroplaste provient vraisemblablement d'une cellule épidermique.

L'une des techniques de transformation directe des protoplastes fait appel à la **micro injection** d'une solution d'ADN directement dans le noyau du protoplaste. Cette technique, mise au point par Melle Croshaw aux USA, nécessite l'utilisation d'un micromanipulateur capable de se saisir individuellement de chaque protoplaste et de lui injecter si possible, directement dans le noyau, une solution tamponnée contenant des fragments d'ADN porteur du gène d'intérêt.

Il s'agit d'une technique délicate qui demande beaucoup d'entraînement. Pour réussir l'injection, le protoplaste pris au sein d'une population en suspension dans la cavité d'une lame creuse, est retenu par une micro-canule en verre dans laquelle on pratique une légère dépression " colle " le protoplaste à son extrémité tandis qu'une micro-aiguille, d'abord amenée au contact du protoplaste dans la région la plus proche du noyau par des mouvements micrométriques, est ensuite introduite dans le noyau. Un mouvement de vis micrométrique, imprimé au piston, permet d'y injecter le contenu en ADN à l'aide d'une seconde micro-seringue.

Une seconde technique de transformation génétique directe fait appel à des **chocs électriques**, brefs mais intenses, appliqués à des protoplastes. Ces chocs provoquent des modifications brèves et réversibles de la perméabilité membranaire permettant à des molécules d'ADN, qui normalement ne peuvent franchir cette membrane, de pénétrer la cellule. Ces molécules peuvent alors s'exprimer, au moins d'une façon transitoire. Par des mécanismes encore partiellement non élucidés, certaines de ces molécules peuvent se retrouver dans le noyau et modifier de façon stable le génome.

Pour franchir plus aisément la membrane déstabilisée, il arrive que l'on emballe les molécules d'ADN dans des formations membranaires artificielles appelées liposomes.

Sur un plan pratique, une électrode constituée de multiples barreaux est immergée dans une suspension de protoplastes sur la platine d'un microscope inversé.

Cette électrode a deux fonctions successives et, pour cela, est reliée successivement à deux types de générateurs de courant, d'abord un générateur de courant à hautes fréquences qui en modifiant les charges électriques de surface des protoplastes permettent leur rapprochement (plus exactement affaiblissent leurs forces de répulsion mutuelle) puis un condensateur alimenté par un générateur de courant continu.

L'intensité de la décharge et sa durée (exprimé en micro ou en milli-secondes) sont adaptées au matériel à électrophorer.

Un double interrupteur (bouton rouge dans une main et poire dans l'autre main pour plus de sécurité pour l'utilisateur) permet la décharge du condensateur dans l'électrode pour une période contrôlée de quelques milli-secondes.

Une troisième technique de transformation directe est née, en 1987, de la convergence d'idée et d'une collaboration d'un chasseur et d'un biologiste. Cette technique, appelée " **biolistique** ", consistait, dans sa forme primitive, à utiliser la force de pénétration de microbilles métalliques tirées par un fusil de chasse ; des microbilles qui ont été, au préalable, trempées dans une solution d'ADN et portant donc, adhérant à leur surface, des molécules d'ADN qui sont ensuite libérées au point d'impact, souvent le cytoplasme, un peu plus rarement le noyau, et parfois même les organites tels que les plastes ou les mitochondries.

Au cours des années, le fusil a été remplacé par une bouteille d'hélium sous pression. Les microbilles ne sont plus réalisées en plomb, qui serait trop toxique pour la cellule, mais en tungstène ou en or.

L'opération est réalisée dans une chambre sorte d'enceinte en inox fermée sur le devant par une porte transparente en plexiglas épais.

Une pompe à palettes permet de mettre temporairement sous vide cette enceinte. Les fragments végétaux sont placés dans une boîte de Pétri elle-même déposée sur une petite étagère de l'enceinte à vide. Les gènes portés par les molécules d'ADN qui ont réussi à s'introduire peuvent s'exprimer sur place, de façon transitoire, ou bien, dans des cas plus rares, s'intégrer dans le génome de la cellule cible.

Sur le plan pratique, l'opération commence par un mélange intime de la solution d'ADN et des microbilles à l'aide d'un vortex. Le mélange est prélevé à la pipette puis déposée sous forme de goutte sur une petite grille, elle même introduite sur une grille placée au fond d'un porte filtre.

Le porte filtre est fixé à la partie supérieure de la chambre, à l'extrémité du sas qui va être chargé en hélium sous pression. Entre le sas et le porte filtre, une électrovanne déclenchée à l'aide d'un boîtier extérieur permet de libérer l'hélium sous pression qui entraînera alors avec violence la micro-goutte du porte filtre.

Le chercheur emballe la totalité de la boîte contenant les disques foliaires avec un voile de gaze, ceci afin d'empêcher la projection des fragments hors de la boîte sous l'effet de la déflagration.

La boîte est déposée sur une étagère dans la chambre étanche puis la porte est refermée. La mise en service de la pompe à vide permet de faire tomber la pression à environ 20 mm de Hg.

La porte vitrée permet de suivre les opérations de transformation par biolistique. Une pression du doigt sur le contact libère le gaz et nous pouvons constater alors l'utilité de la gaze sans laquelle nous aurions une dispersion importante des disques foliaires dans tout le volume de la chambre.

On voit sur le papier filtre, disposé au fond de la boîte, la silhouette claire des disques sur un fond plus sombre qui témoigne de l'importance du nombre de particules métalliques émises.

Les disques foliaires sont ensuite déposés sur un milieu nutritif contenant un produit capable de sélectionner les cellules transformées.

**Durée : 3 minutes et 35 secondes**

## Partie 3 : Sélection et développement des plantes transformées

### Séquence 6 : stades de cultures *in vitro*.

Quelque soit la technique de transformation génétique utilisée, que ce soit par l'intermédiaire des agrobactéries ou par micro injection d'ADN, ou encore par électroporation, les cellules ne sont jamais toutes transformées et il convient donc de sélectionner, de trier les cellules véritablement transformées de toutes les autres et ainsi obtenir, par régénération, des plantes dont toutes les cellules descendantes des cellules transformées conservent ces propriétés.

Cette sélection demande quelques temps car la manifestation de l'effet de l'antibiotique sur les cellules non transformées n'est pas immédiate. Les disques placés sur le milieu de sélection vont perdre progressivement leur couleur verte.

Une semaine plus tard la couleur verte tend à être remplacée par une couleur jaune traduisant une profonde altération de la biosynthèse de la chlorophylle.

Deux semaines après la mise sur milieu de sélection, on commence à constater la persistance de massifs cellulaires sur les bords du disque, c'est à dire dans la zone de blessure, qui conservent une nette couleur verte. Ces cellules survivent à l'action de l'antibiotique grâce au gène de résistance acquis en même temps que le gène d'intérêt.

Au bout de trois semaines de culture sur milieu de sélection, les zones de régénération issues des cellules génétiquement transformées apparaissent comme des massifs vert intense, c'est au sein de ces massifs que vont apparaître les zones méristématiques à l'origine des nouvelles plantes.

Après quatre semaines de culture, les massifs méristématiques ont donné naissance à de véritables petites plantes tandis que certains disques foliaires dont aucune cellule n'a été transformée continuent à blanchir par suite de la mort des cellules.

Après deux mois de culture, les plantules poursuivent leur développement. Ces cultures sont réalisées en conditions contrôlées de température et de lumière dans une chambre de culture à l'intérieur de laquelle se côtoient des cultures d'âges différents.

Lorsque le développement des plantes régénérées est important ces plantes sont transférées dans des boîtes dites " boîtes Magenta " de volume nettement supérieur à celui des boîtes de Pétri. Ce transfert se fait en conditions stériles sous hotte à flux laminaire, les différentes plantes venant de massifs méristématiques distincts sont séparées les unes des autres ; il y aussi excision du cal qui se développe à la base des régénérations.

Ces plantes issues de régénération ont déjà développé plusieurs feuilles mais ont généralement un appareil racinaire assez peu développé ; ce système se développera par la suite. Chaque plante est donc transférée dans une boîte Magenta individuelle à l'aide de longues pinces stériles.

A deux mois et demi, la plante occupe une bonne partie du volume de la boîte Magenta.

La plante est maintenant âgée de trois mois, les entrenœuds se sont nettement développés. A quatre mois, les feuilles se sont élargies et le sommet de la plante s'approche du couvercle de la boîte. Pendant tout ce temps l'appareil racinaire se développe et comble progressivement le retard de développement qu'il avait sur la partie aérienne.

Retour dans la chambre de culture où ces plantes vont achever leur période de vie *in vitro*. A ce stade de développement, les plantes génétiquement transformées sont suffisamment développées pour sortie de l'*in vitro* et être transplantées sur terreau.

Ce transfert est un épisode délicat pour la plante qui va être pour la première fois de sa vie confrontée avec des milieux non aseptiques c'est à dire à des bactéries et à des champignons.

Cette période de transition est appelée " période d'acclimatation " et le maintien d'un taux élevé d'humidité est indispensable durant toute cette période.

Pour cela, on place la plante sous une petite cloche de plastique. Très souvent, le fond retourné d'une bouteille d'eau minérale fait l'affaire.

**Durée : 2 minutes et 30 secondes**

## **Séquence 7 : stade de culture sous serre.**

A partir de ce transfert en pot ; la plante va être placée dans une serre spéciale avec des compartiments appelés chapelles, spécialisées et dédiées aux plantes transgéniques.

L'accès à ces compartiments spécifiques est réglementé. L'accès se fait par l'intermédiaire d'un sas qui isole les chapelles transgéniques du reste de la serre. Le sas est refermé derrière le chercheur. Il doit d'abord enfiler des bottes puis une blouse ; ces vêtements ne devant sortir en aucun cas du sas c'est à dire de la zone de confinement.

Le chercheur se lave soigneusement les mains, ceci dans un soucis de séparation des cultures transgéniques des autres afin de ne transférer ni bactérie, ni spore de champignon, ni pollen. Le chercheur, enfin prêt, peut entrer dans la chapelle transgénique et retrouver ses OGM. Certaines de ces plantes arrivées à floraison ont leurs fleurs enfermées dans un sac de gaze pour éviter tout échange de pollens d'une plante à l'autre et assurer ainsi une autogamie.

La serre est elle même isolée du milieu extérieur par des filtres placés sur toutes les bouches d'aération ; ces filtres interdisent tout passage d'insectes ou de grains de pollen. Grâce à des conditions parfaitement contrôlées, notamment en ce qui concerne son alimentation hydrique, la plante poursuivra sa croissance jusqu'à la floraison, puis la fécondation et enfin la formation de la graine, avec à l'intérieur un embryon de la génération suivante.

Celui-ci aura définitivement acquis cette nouvelle propriété et il doit être en mesure de la transmettre ainsi de génération en génération.

**Durée : 1 minute et 30 secondes**

### **Suggestions d'activités**

- **S'informer**
  - Sur les techniques de sélection et d'amélioration des plantes.
  - Découvrir les techniques de génie génétique.
  - Sur la notion d'OGM.
- **Communiquer**
  - Réaliser un schéma de la fabrication d'un OGM.
- **Raisonnement**
  - Participer à un débat sur les OGM dans le cadre de l'ECJS par exemple.