

Dossier d'information scientifique sur les pommes de terres résistantes au *phytophthora*



Les pommes de terre résistantes au *Phytophthora*

Le *Phytophthora infestans* provoque le ‘mildiou de la pomme de terre’, la maladie qui menace le plus la culture des pommes de terre dans les régions à climat tempéré. Elle coûte aux agriculteurs de Belgique environ 55 millions d’euros chaque année et les moyens de lutte contre cette maladie sont polluants pour l’environnement. Toutefois, des variétés ayant fait l’objet d’une amélioration génétique conventionnelle les rendant résistantes au *Phytophthora* font leur apparition sur le marché depuis quelques années et des lignées génétiquement modifiées résistantes au *Phytophthora* sont en cours d’élaboration. Les variétés résistantes conventionnelles ont vu le jour à l’issue d’un programme d’amélioration génétique complexe qui a duré des années. Ainsi, les variétés Bionica et Toluca possèdent un gène de résistance et la Sarpo Mira comporte un mélange de différents gènes produisant une grande résistance. Ces variétés sont utilisées à échelle réduite actuellement, principalement pour la culture biologique. Les pommes de terre Bionica et Toluca ne sont cultivées que pour le marché du frais, car elles ne disposent pas des caractéristiques adéquates pour la transformation industrielle. La Sarpo Mira sert généralement à la fabrication des frites.

Dans les pommes de terres génétiquement modifiées résistantes au *Phytophthora* en développement sont implantés généralement plusieurs gènes de résistance, de même que dans une variété aux caractéristiques intéressantes pour l’industrie. Ces pommes de terre ne sont pas encore commercialisées, mais elles sont testées en champ expérimental à différents endroits. Il faudra probablement attendre jusqu’en 2013 avant que de telles pommes de terre ne soient disponibles sur le marché.

A propos de ce dossier

Ce dossier du VIB (Vlaams Instituut voor Biotechnologie) fait le point des connaissances scientifiques sur les pommes de terre résistantes au *Phytophthora infestans*, mieux connu sous le nom de 'mildiou de la pomme de terre'. Le VIB est un institut scientifique où travaillent 1200 chercheurs, avec des groupes de recherche à l'UGent, la K.U.Leuven, l'Universiteit Antwerpen et la Vrije Universiteit Brussel. Le gouvernement flamand a chargé le VIB de diffuser des informations scientifiquement étayées sur la biotechnologie.

A propos des références

Chaque paragraphe de ce dossier présente des références aux publications dont les informations sont issues. Ces publications peuvent parfois être intégralement téléchargées, parfois elles ne sont pas disponibles. Dans ce cas, vous pouvez consulter l'auteur ou rechercher la publication dans la bibliothèque universitaire la plus proche.

Les pommes de terre résistantes au <i>Phytophthora</i>	2
A propos de ce dossier.....	3
A propos des références.....	3
En Belgique, le secteur de la transformation de la pomme de terre est prospère.....	6
<i>Phytophthora infestans</i> – ‘le mildiou de la pomme de terre’ –est la principale menace pour la culture de la pomme de terre.....	6
Le <i>Phytophthora infestans</i> attaque les feuilles comme les tubercules et est très infectieux.....	7
Au fil des ans, le <i>Phytophthora infestans</i> est devenu plus agressif.....	9
Le <i>Phytophthora infestans</i> entraîne des coûts très élevés.....	9
Pollution environnementale provoquée par la lutte contre le <i>Phytophthora infestans</i>	10
Méthodes pour limiter le développement de l’infection <i>Phytophthora</i>	10
La culture de variétés résistantes est la meilleure méthode pour limiter la maladie.....	10
En cas de maladie, il faut intervenir rapidement.....	11
Amélioration conventionnelle de la résistance.....	11
Les gènes de résistance simples sont facilement surmontés par le <i>Phytophthora</i>	13
Introduction de la résistance au <i>Phytophthora infestans</i> grâce à la modification génétique.....	14
La modification génétique pour la résistance au <i>Phytophthora infestans</i> par étapes.....	14
La culture des variétés résistantes conventionnelles.....	17
Résistance durable.....	18
La pomme de terre Fortuna de BASF.....	18
Le projet de cisgénèse DuRPh.....	19
La cisgénèse fait l’objet de discussions législatives au niveau européen.....	20
Les pommes de terre génétiquement modifiées résistantes au <i>Phytophthora</i> ne menacent pas l’environnement.....	20
La sensibilité alimentaire des pommes de terre génétiquement modifiées résistantes au <i>Phytophthora</i>	21
La pomme de terre génétiquement modifiée résistante au <i>Phytophthora</i> n’est pas encore commercialisée.....	22

Les pommes de terre sont cultivées dans le monde entier, également en Belgique

La pomme de terre est cultivée pour produire des aliments et de la féculé. Les pommes de terre sont cultivées dans plus de 100 pays. En 2006, 315 millions de tonnes de pommes de terre ont été produites à l'échelon mondial. La Chine et l'Inde sont responsables de 30% de la production.

Les pommes de terre sont originaires des Andes, en Amérique du Sud, où elles sont cultivées depuis plus de 7000 ans. Les explorateurs les ont ramenées des Andes en Europe en 1565, où elles sont restées longtemps confinées dans les jardins botaniques. Après quelques mauvaises récoltes successives des céréales traditionnelles, les pommes de terre ont été cultivées à des fins alimentaires et ont commencé à conquérir le monde au départ de l'Europe. Les pommes de terre poussent le mieux dans les climats tempérés, où la saison sans gel est suffisamment longue. Sous les 10 °C et au-delà de 25 °C, la croissance du tubercule est freinée.

Il existe trois types de cultures: les plants de pommes de terre, les pommes de terre de consommation et les pommes de terre destinées à la production de féculé. La culture de plants de pommes de terre est destinée à la multiplication des plantes. Les Pays-Bas sont spécialisés dans cette culture et exportent leurs plantes dans les pays du monde entier. La culture des pommes de terre de consommation est la plus importante. Elle produit les pommes de terre que nous consommons tous : des pommes de terre à cuire aux frites congelées, mais aussi celles qui entrent dans la composition des snacks, comme les chips. Les pommes de terre destinées à la production de féculé sont utilisées pour des applications industrielles: colles, textiles, papier, matériaux de construction, etc. Ces variétés sont sélectionnées spécialement pour leur aptitude à produire de la féculé pour les applications industrielles. Elles sont comestibles, mais pas très savoureuses.

En Belgique, la superficie des cultures de pommes de terre a considérablement augmenté : elle est passée à près de 81.000 hectares en 2010, produisant chaque année plus de 3 millions de tonnes. La Flandre génère la majorité de la production, de 55 à 60% du total. En Belgique, la culture concerne majoritairement les pommes de terre de consommation, puis viennent les plants de pommes de terre. Les pommes de terre destinées à la production de féculé ne sont pas cultivées en Belgique.

www.potato2008.org

En Belgique, le secteur de la transformation de la pomme de terre est prospère

En Belgique, environ 3 millions de pommes de terre sont traitées par le secteur très prospère et en plein développement des transformateurs, principalement des entreprises familiales fortement orientées sur le commerce international.

Le fait que la quantité de pommes de terre produites soit identique à la quantité de pommes de terre transformées ne signifie pas que toutes les pommes de terre belges soient transformées en Belgique. Des échanges commerciaux importants s'effectuent avec nos pays environnants : une partie des pommes de terre produites en Belgique sont transformées à l'étranger et une partie des pommes de terre transformées en Belgique proviennent de l'étranger.

Les pommes de terre de consommation sont transformées en Belgique en un large éventail de produits de pommes de terre: des frites (congelées) à la purée, des croquettes aux gaufrettes, des chips aux flocons de pommes de terre. Contrairement aux industries de transformation de la pomme de terre dans certains autres pays, nos entreprises ne possèdent pratiquement pas de marques propres. Lutosa est l'une des rares exceptions. La plupart des entreprises fabriquent des produits pour d'autres marques.

www.belgapom.be

Phytophthora infestans – 'le mildiou de la pomme de terre' –est la principale menace pour la culture de la pomme de terre

Les pommes de terre sont attaquées par différents parasites et maladies, mais le mildiou est le principal problème dans les régions de culture où le climat est tempéré. La pomme de terre est également menacée par les nématodes (*Globodera pallida*, *Globodera rostochiensis* et *Meloidogyne spp*), et quelques bactéries comme la pourriture brune (*Ralstonia solanacearum*), la pourriture annulaire (*Clavibacter michiganensis*) et la jambe noire (*Dickeya spp*). Le mildiou est provoqué par l'oomycète *Phytophthora infestans*, un organisme fongique. Il est connu depuis la 'Grande Famine' qui a sévi en Irlande vers 1845. La maladie a ravagé les récoltes de pommes de terre pendant plusieurs années successives en Irlande et a même entraîné un tournant dans l'histoire irlandaise. Environ un million d'Irlandais sont morts de faim et tout autant ont émigré aux Etats-Unis pour y commencer une nouvelle vie. Le *Phytophthora infestans* est parti d'Amérique centrale en 1843, il a traversé les Etats-Unis et l'Océan Atlantique pour arriver en Europe. La 'Grande Famine' a eu lieu deux ans plus tard seulement.

La sensibilité des pommes de terre au *Phytophthora infestans* diffère d'une variété à l'autre, mais peu possèdent une véritable résistance. La Bintje, qui représente aujourd'hui encore de 40 à 50 pour cent de la culture des pommes de terre en Flandre, est très sensible à la maladie. Les cultivateurs flamand pulvérisent leurs cultures de 10 à 15 fois par an, avec des produits qui sont relativement nocifs pour l'environnement. Le nombre de pulvérisations nécessaires dépend des conditions climatiques.

Le *Phytophthora infestans* attaque les feuilles comme les tubercules et est très infectieux

Le *Phytophthora infestans* attaque les feuilles, les tiges et les tubercules. Des lésions (taches) se développent sur les feuilles. Leur aspect dépend fortement du temps. Le plus souvent, ce sont des taches d'1 à 2 cm de diamètre qui virent lentement au brun foncé. Les taches brunes sont d'abord entourées d'un bord jaune. A l'envers de la feuille se développe une moisissure blanche lorsque le temps est humide. Lorsque le climat est favorable aux moisissures, les feuilles attaquées finissent par se rabougrir complètement. Sur les tiges se développent des lésions brunes allongées qui couvrent toute la tige. Les tubercules touchés développent des yeux ou des crevasses et la contamination peut s'effectuer pendant la croissance comme en cours de récolte ou durant la conservation. La contamination devient visible lorsque des taches bleuâtres perçant la peau se forment, puis virent au brun-rouille avec le temps. Souvent, l'infection du tubercule se mue en pourriture sèche ou humide (contaminations bactériennes), et la pourriture humide peut ensuite se transmettre à des tubercules sains. Ainsi, quelques tubercules colonisés par le *Phytophthora infestans* peuvent finalement provoquer de lourdes pertes de conservation.



Photo: un champ de pommes de terre gravement attaquées par le Phytophthora

Le *Phytophthora* se développe le mieux à des températures moyennes et une humidité relative élevée. La pénétration dans la feuille peut se faire lorsque celle-ci est restée humide suffisamment longtemps. La maladie se répand alors surtout par les spores asexuées (zoosporangies) formées par la moisissure blanche. La maladie est très contagieuse. Les spores sont disséminées par le vent ou les gouttes de pluie.



Photo: les effets du Phytophthora sur les tubercules attaqués.

Le *Phytophthora infestans* survit en hiver sous forme de fils de moisissure dans les tubercules contaminés. Les tas de déchets avec des pommes de terre sont des endroits favorables à la survie de la maladie. Les drageons des tubercules restés sur le champ sont également des mécanismes d'hivernage importants. Depuis quelques années, la maladie survit aussi via les spores sexuées (oospores), issues de l'union des 'matingtypes' A1 et A2. Le mating type A2 n'était pas présent auparavant dans nos terres de culture, de sorte que la survie via les oospores est un phénomène assez récent. Les oospores survivent de 1 à 3 ans dans le sol et peuvent provoquer la dissémination de la maladie, surtout en cas d'alternance insuffisante des cultures.

<http://www.agris.be/nl/aardappelziekte/194003.asp#alg>

Au fil des ans, le *Phytophthora infestans* est devenu plus agressif

La lutte contre la maladie est devenue plus difficile au fil du temps, parce que la population de *Phytophthora infestans* comporte des isolats plus agressifs et que la diversité s'est accrue suite à la recombinaison entre les différents 'mating types' qui n'étaient pas présents sur le même territoire auparavant. Cette agressivité accrue s'exprime par une durée de pénétration et un cycle de maladie plus courts, davantage de générations dans une même saison de croissance et une tolérance thermique supérieure.

Le *Phytophthora infestans* entraîne des coûts très élevés

En Europe, les pommes de terre sont cultivées sur près de 2 millions d'hectares, et leur récolte représente une valeur de quelque 6 milliards d'euros. On estime que la mildiou de la pomme de terre entraîne une perte économique d'environ 1 milliard d'euros en Europe, à cause des coûts de lutte contre la maladie (achat des fongicides + coût des pulvérisations) et des coûts consécutifs aux pertes de rendement et de conservation. Pour les cultivateurs de pommes de terre belges, le mildiou de la pomme de terre représente un poste de coût annuel d'à peu près 55 millions d'euros.

Haverkort et al., Societal Costs of Late Blight in Potato and Prospects of Durable Resistance Through Cisgenic Modification, Potato Research (2008) 51:47-57

Pollution environnementale provoquée par la lutte contre le *Phytophthora infestans*

En Belgique, on utilise chaque année une très grande quantité de fongicides pour tenter de contrôler le *Phytophthora*: plus de 1000 tonnes de substance active par an. En Flandre, les cultivateurs utilisent environ 17 kg de substance active par hectare et par an pour la lutte contre le *Phytophthora*. Les trois substances actives principales sont (en ordre décroissant d'importance): le mancozeb, le cymoxanil et le propamocarb.

Source: Vlaamse overheid, Departement Landbouw en Voeding, Afdeling Monitoring en Studie – LMN, data 2008

Méthodes pour limiter le développement de l'infection *Phytophthora*

La lutte contre les drageons et la destruction des pommes de terre dans les tas de déchets sont d'importantes mesures pour limiter la propagation de la maladie. Certains pays imposent ces mesures. Elles permettent de prévenir les foyers de *Phytophthora* d'où la maladie peut se propager, mais pas de lutter contre les spores sexuées (oospores). Une alternance suffisante des cultures permet de lutter efficacement contre la dissémination de la maladie via les oospores. Une seconde méthode pour limiter la propagation consiste à suivre scrupuleusement les instructions des services d'avertissement. Une dernière option consiste à réduire la culture des pommes de terre – moins il y a de cultures de pommes de terre, moins la maladie se répand, mais cette option n'est pas évidente dans un pays de culture de la pomme de terre comme la Belgique.

La culture de variétés résistantes est la meilleure méthode pour limiter la maladie

Dans un pays où la culture des pommes de terre est intensive, la meilleure façon de réduire la maladie est de cultiver des races résistantes. Plus la surface cultivée en variétés résistantes est importante, moins la maladie est présente. Il importe d'introduire suffisamment de gènes de résistance, à défaut, on crée une pression trop importante au niveau de la sélection sur le nombre limité de gènes de résistance, avec une adaptation très rapide de la population de *Phytophthora* en conséquence.

La superficie cultivée en variétés résistantes ne doit pas atteindre 100% pour réduire l'incidence de la maladie. On peut effectuer la comparaison avec la papaye résistante aux virus de Hawaii. Quarante pour cent de la superficie cultivée en papaye concernant des variétés résistantes, qui réduisent suffisamment la maladie pour pouvoir planter des variétés non résistantes sur les

20 % de terres résiduelles, sans que cela ne pose de problème sanitaire. Aujourd'hui, seules quelques variétés de pommes de terre résistantes sont disponibles: Bionica, Toluca et Sarpo Mira. Elles sont présentées plus loin dans ce dossier.

En cas de maladie, il faut intervenir rapidement

Quand la présence de *Phytophthora* est constatée dans une parcelle, il faut intervenir rapidement. Dans la pratique, la maladie est contrôlée grâce aux fongicides. La prévention (traitement avant la pénétration de la moisissure dans la plante) est essentielle pour obtenir de bons résultats. Seuls quelques produits ont un effet destructif limité.

La destruction du feuillage est une autre méthode efficace pour prévenir une dissémination dans et en dehors de la parcelle. Mais la destruction du feuillage au moment où la plante n'est pas encore prête à être récoltée a d'importantes conséquences. Chez les variétés à maturation tardive, les tubercules se développent encore beaucoup les dernières semaines avant la récolte. La destruction précoce du feuillage implique une perte du potentiel de rendement. Au lieu de 45 à 60 tonnes par hectare, la récolte peut ne pas dépasser 35 tonnes par hectare, voire moins. La destruction du feuillage n'est donc pratiquée que lorsque celui-ci est déjà en train de dépérir.

Amélioration conventionnelle de la résistance

Bionica et Toluca

Les Pays-Bas ont commencé voici plus de 40 ans déjà à effectuer des croisements de gènes naturels de résistance dans les variétés de pommes de terre commerciales. Les gènes de résistance proviennent des *Solanaceae* à tubercules sauvages des Andes. Le tout premier croisement date de 1959 et il a fallu attendre jusqu'en 2005 pour obtenir quelques variétés utilisables: Bionica et Toluca. Les deux variétés contiennent le même gène de résistance simple, le *Rpi-blb-2*, du *Solanum bulbocastanum*.

Le croisement classique des gènes de résistance dans la culture des pommes de terre nécessite beaucoup de travail et de patience. La pomme de terre ne peut en effet pas toujours être croisée avec les variétés sauvages comportant les gènes de résistance. Un programme de croisement plus complexe doit alors être mis en œuvre, en recourant au 'bridge cross breeding'. Il ne permet que de croiser un seul gène de résistance à la fois, sauf si la variété sauvage comporte plusieurs gènes de résistance, situés à proximité sur l'ADN de cette variété sauvage. Après le croisement avec les variétés sauvages, de nombreux rétrocroisements sont

nécessaires pour obtenir à nouveau les caractéristiques propres aux pommes de terre de culture. Voici le schéma de croisement qui a produit les variétés résistantes conventionnelles Bionica et Toluca.

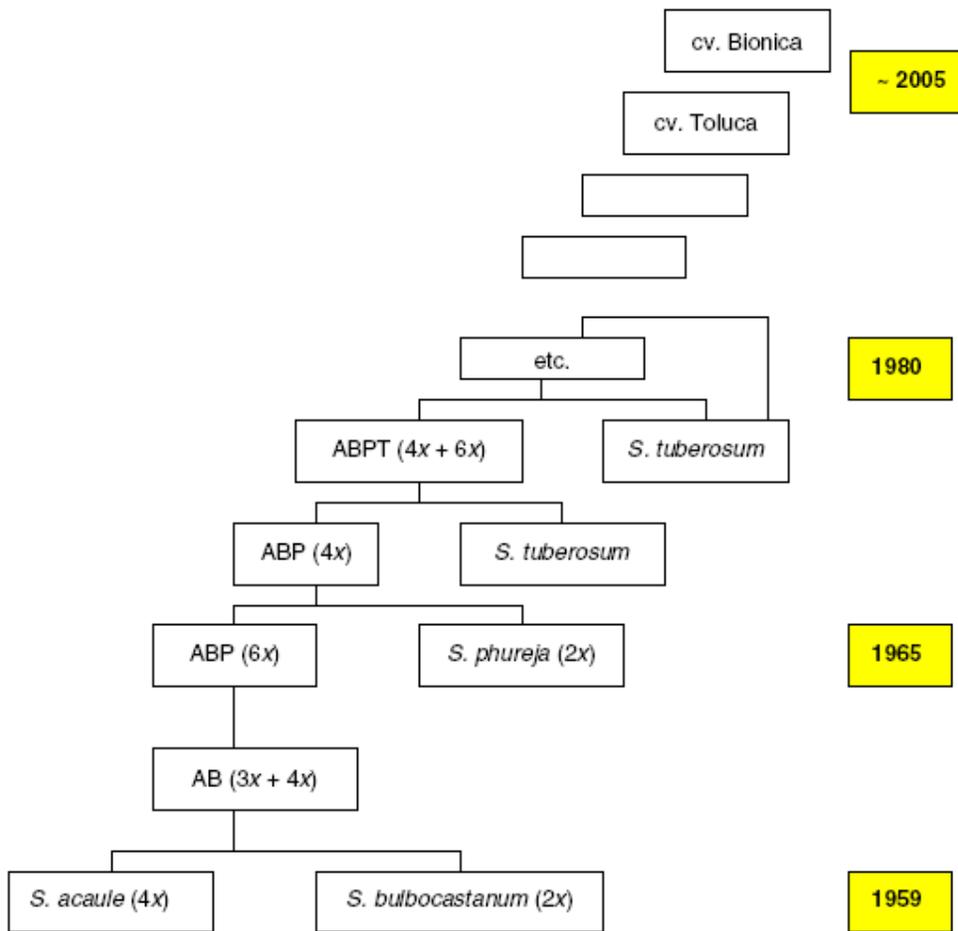


Fig. 3 Scheme of interspecific bridge cross breeding activities with late blight resistant *S. bulbocastanum* at Wageningen University and Research Centre and private breeding companies in the Netherlands. After 46 years the first resistant varieties Bionica and Toluca appeared, containing the single broad spectrum resistance gene *Rpi-blb2*. Note that stacking of *R* genes through this approach would even be more complicated and slow

www.meijer-potato.com

www.agrico.com

Sarpo Mira

Outre la Bionica et la Toluca, il existe aujourd’hui une troisième variété de pomme de terre très résistante, la Sarpo Mira. Cette variété n’est pas originaire des Pays-Bas, mais de Hongrie. La

variété a une longue histoire derrière elle, comme la Bionica et la Toluca. La tradition veut que 40 années de travail aient été nécessaires pour obtenir le niveau de résistance actuel. Les chercheurs ont procédé comme suit. Ils ont rassemblé un maximum de formes différentes de résistance, de tolérance et de sensibilité. Sur base de ce pool de gènes, ils ont pratiqué un maximum de croisements. Les plantes obtenues avec les semences ont ensuite été contaminées à un stade précoce avec un mix aussi large que possible de *Phytophthora infestans*. Lorsque 95% des plantes sont mortes, le *Phytophthora* des plantes résiduelles a été neutralisé avec un fongicide et les plantes ont poursuivi leur croissance. Ensuite, les chercheurs ont travaillé avec les tubercules obtenus. Jusqu'à l'effondrement des régimes communistes. L'institut où s'effectuait la recherche sur les pommes de terre a fermé ses portes et c'est grâce aux scientifiques impliqués que les meilleurs matériaux n'ont pas été perdus.

Quelques années plus tard, le matériel a été redécouvert en Roumanie à l'occasion d'une contamination totale au *Phytophthora*. L'entreprise danoise Danespo a repris le matériel et donné aux scientifiques d'Europe de l'Est une nouvelle base pour poursuivre leur travail. Avec les résultats obtenus, Danespo a ensuite commercialisé la variété Sarpo Mira.

www.danespo.com

Les gènes de résistance simple sont facilement surmontés par le *Phytophthora*

Il est connu que le *Phytophthora* passe facilement outre les résistances simples. A cause de la grande diversité génétique des populations de *Phytophthora infestans*, des génotypes sont déjà présents ou se sont déjà développés (les mutants) qui ont pu contourner le mécanisme du seul gène de résistance présent. Ces mutants bénéficient d'un avantage sélectif par rapport aux variétés sauvages et prolifèrent rapidement, de sorte que la population se compose très vite de formes mutantes principalement. Lorsque plusieurs gènes de résistance sont présents dans une variété de pomme de terre, la moisissure a plus de mal à s'adapter, génétiquement, aux 2 gènes de résistance en même temps. Ainsi que nous l'avons dit, les variétés Bionica et Toluca possèdent le gène de résistance simple *Rpi-blb-2*. Cette résistance n'a pas encore été vaincue dans les champs actuellement. Les variétés offrent toujours une bonne protection. Le fait qu'elles ne soient cultivées qu'à petite échelle – principalement par les cultivateurs bio et les cultivateurs amateurs – limite la possibilité de passer outre la résistance. Mais on sait toutefois qu'il existe déjà des isolats insensibles au gène *Rpi-blb-2*. Aux Pays-Bas, les cultivateurs des variétés Bionica et Toluca ont été priés de bien surveiller leurs cultures et de détruire immédiatement le feuillage au moindre signe d'attaque par le *Phytophthora*. A défaut, ils peuvent être tenus pour responsables de la diffusion à plus grande échelle des isolats de

Phytophthora ayant passé outre la résistance. Dans ce cas, les fruits de 40 ans d'amélioration génétique pourraient être rapidement perdus.

Introduction de la résistance au *Phytophthora infestans* grâce à la modification génétique

Depuis quelques années, des gènes de résistance sont également introduits par modification génétique dans les pommes de terre. Celle-ci se pratique aux Etats-Unis (Cornell University), au Royaume-Uni (Sainsbury Laboratory, John Innes Center), au Pérou (Centro Internacional de la Papa (CIP)), en Allemagne (BASF) et aux Pays-Bas (Wageningen UR), mais pas en Flandre. L'avantage de la technique de modification génétique par rapport à l'amélioration classique est qu'elle permet de développer beaucoup plus rapidement et de manière plus ciblée plusieurs variétés résistantes simultanément. Cet apport par modification génétique peut en outre s'effectuer sans perte des caractéristiques de la variété.

La modification génétique pour la résistance au *Phytophthora infestans* par étapes

ETAPE 1: l'identification des gènes de résistance

Pour rendre les pommes de terre résistantes au *Phytophthora*, il faut d'abord obtenir les gènes de résistance. Des variétés sauvages de notre pomme de terre de culture sont d'abord semées, puis leur résistance est testée, d'abord par un simple test *in vitro*. Des milliers de géotypes sauvages ont ainsi été testés. Une 'DNA fingerprint', une empreinte ADN de chacune de ces plantes est également réalisée. Lorsque les plantes présentent une résistance, un test des feuilles est effectué avec quelques isolats de *Phytophthora* spécifiques pour apprendre à mieux connaître l'interaction avec la moisissure. Les plantes qui semblent résistantes sont ensuite testées dans le cadre d'un essai sur champ. Il reste alors un petit nombre de géotypes résistants.

En comparant l'ADN des plantes résistantes avec les plantes qui ne sont pas résistantes, on peut détecter dans cet ADN les domaines où se situe la résistance. La recherche de gènes de résistance est aujourd'hui facilitée par le fait que le génome de la pomme de terre soit totalement séquencé au niveau de la paire de base: l'ordre de l'ADN est connu, lettre par lettre. On trouve ainsi chaque année plusieurs nouveaux gènes de résistance. Aujourd'hui, une vingtaine de gènes de résistance sont connus et

disponibles. Les gènes isolés sont également appelés cisgènes, parce qu'ils proviennent de variétés pouvant être croisées et qui sont également utilisées dans l'amélioration traditionnelle.

ETAPE 2: la modification des lignées de pommes de terre

Une fois qu'un gène de résistance est disponible, il peut être introduit dans la pomme de terre. L'opération s'effectue comme suit: dans une première étape, le gène est introduit dans l'ADN de la bactérie du sol *Agrobacterium tumefaciens*. Il est intégré dans un fragment d'ADN que la bactérie transmet par nature à l'ADN de la plante lorsqu'elle est infectée par la bactérie.

Des petits morceaux de tissu de la pomme de terre sont mis dans un bac de culture dans lequel un milieu de culture est présent et où la plante peut pousser. Ensuite, la bactérie *Agrobacterium* modifiée est appliquée sur ce tissu. La bactérie infecte le tissu et transmet les gènes de résistance à l'ADN de la plante. Ensuite, une nouvelle plante peut être produite à partir du tissu de la pomme de terre, en ajoutant différentes hormones de la plante au milieu de culture, qui poussent le tissu à créer des racines et du tissu végétal vert aérien.

Toutes les cellules ne sont pas infectées par l'*Agrobacterium*, de sorte que le fragment d'ADN n'est pas présent dans toutes les cellules du tissu végétal. C'est pourquoi il faut sélectionner les plantes qui ont réellement intégré l'ADN, ce qui peut se faire de deux façons. La première méthode est l'association à un autre gène: un marqueur de sélection. Il peut s'agir d'un gène de résistance aux antibiotiques ou de tolérance à un herbicide. Lorsque l'antibiotique ou l'herbicide sont ajoutés au milieu de culture, seules les plantes ayant réellement intégré l'ADN survivent. Il s'agit d'une méthode de sélection simple.

Les marqueurs de sélection proviennent souvent de bactéries ou de plantes avec lesquelles la pomme de terre ne peut pas se croiser naturellement. Elles ne sont pas de la même espèce. Les plantes dans lesquelles des gènes d'une autre espèce ont été introduits par modification génétiques sont également qualifiées parfois de 'transgéniques'.

Dans la seconde méthode de sélection, aucun marqueur de sélection n'est ajouté à l'ADN à transférer. Toutes les plantes générées sont cultivées, même celles qui n'ont pas intégré d'ADN. Ensuite, de l'ADN est prélevé sur toutes les plantes et un test génétique

basé sur la PCR¹ permet de déterminer si la plante a intégré l'ADN souhaité. Cette méthode de sélection est un peu plus complexe et prend plus de temps. Les plantes qui n'ont pas intégré l'ADN sont éliminées.

Les plantes résistantes sans marqueur de sélection comportent uniquement l'ADN introduit par modification génétique provenant de pommes de terre ou de plantes avec lesquelles la pomme de terre peut se croiser naturellement. On qualifie ces plantes également de 'cisgéniques'. Les plantes cisgéniques sont fort comparables aux plantes obtenues par amélioration classique. Seule la technologie d'introduction de l'ADN diffère.

ETAPE 3: test des plantes en serre

Le premier stade de croissance des pommes de terre génétiquement modifiées s'effectue généralement dans une salle de culture. Lorsque les plantes ont grandi, elles sont placées dans une serre, où elles peuvent être cultivées en pot ou en pleine terre. La culture en serre a plusieurs objectifs. En première instance, il s'agit surtout de détecter si les caractéristiques souhaitées sont présentes. La résistance au *Phytophthora* est la première caractéristique importante. Seules les plantes présentant une résistance lors du test simple des feuilles sont utilisées. Il s'agit aussi de contrôler les caractéristiques de la variété. Toutes les caractéristiques importantes sont-elles encore présentes ? Les caractéristiques de la variété peuvent se perdre à cause de trois phénomènes: (1) 'la mutagenèse par insertion', (2) 'la pléiotropie', ou (3) 'la variation somaclonale'.

La mutagenèse par insertion est une erreur consécutive au fait que le fragment d'ADN supplémentaire atterrit au milieu d'un gène existant et perturbe ainsi le fonctionnement de ce gène. La pomme de terre est tétraploïde, ce qui veut dire qu'elle possède 4 exemplaires de chaque chromosome (4 'homologues'). L'ADN introduit aboutit dans l'un des quatre chromosomes, ce qui signifie que si la modification entraîne une mutation, celle-ci ne sera présente que dans l'un des quatre gènes sur les quatre chromosomes homologues. Les trois autres gènes restent donc intacts. Une mutation consécutive à une insertion d'ADN n'entraîne donc presque jamais de modification observable des caractéristiques de la pomme de terre.

La pléiotropie est l'apparition d'effets inattendus et indésirables suite au fait que le fragment d'ADN supplémentaire atterrit à un endroit inconnu à l'avance dans l'ADN de la plante et peut par exemple perturber le fonctionnement des gènes situés à proximité.

¹ PCR = Polymerase Chain Reaction, réaction en chaîne par polymérase

La variation somaclonale est le développement d'anomalies phénotypiques (= observables) par rapport à la pomme de terre d'origine suite à la mise en culture *in vitro* et la régénération de la pomme de terre. Ce dernier phénomène est donc totalement indépendant de la technique de la modification génétique et se produit également en cas de multiplication *in vitro* ordinaire.

Il convient donc d'effectuer une sélection stricte en serre également et de ne sélectionner que les plantes qui sont 'true-to-type', en d'autres termes, qui possèdent encore toutes les caractéristiques importantes de la variété. Les plantes qui présentent une résistance et qui sont true-to-type sont utilisées pour la suite des opérations. C'est pourquoi des tests des feuilles sont également réalisés avec de véritables isolats de *Phytophthora*. Et les plantes qui remportent un bon score entrent en ligne de compte pour un test en champ.

La culture des variétés résistantes conventionnelles

Les variétés de pommes de terre diffèrent en termes de sensibilité au *Phytophthora*. Des variétés comme la Bintje et la Nicola sont très sensibles à la maladie. Les variétés anciennes peuvent, à cause de leur cycle court de croissance, éventuellement échapper à la menace du *Phytophthora*. Mais seules quelques variétés comme la Bionica, la Toluca et la Sarpo Mira possèdent une véritable résistance basée sur un ou plusieurs gènes R. Les gènes de résistance provenant du *Solanum demissum* présents dans certaines variétés sont souvent surmontés et ne peuvent plus être utilisés. Bionica, Toluca et Sarpo Mira sont commercialisées par les entreprises néerlandaises Meijer et Agrico et la société danoise Danespo. La Bionica et la Toluca ne sont cultivées que pour le marché du frais. Meijer propose la pomme de terre Bionica uniquement pour le marché biologique. Agrico propose la Toluca pour la culture biologique et la culture conventionnelle, mais cette pomme de terre est utilisée surtout pour la culture biologique. Les pommes de terre sont commercialisées depuis plusieurs années déjà et en 2009 leur résistance en champ était toujours bonne. La Bionica est vendue en Belgique via AVEVE pour les cultivateurs amateurs. En 2010, AVEVE a vendu environ 10.000 kg de plants de Bionica à des cultivateurs amateurs, qui ont cultivé plus de 10 hectares de Bionica. Il s'agit bien sûr d'une goutte d'eau dans l'océan, mais la culture amateur est considérée depuis toujours comme une source potentielle de dissémination du *Phytophthora* dans les cultures commerciales, parce que les amateurs ne luttent pas beaucoup contre le *Phytophthora*. Une toute petite quantité de Bionica peut quand-même avoir un impact sur la prévalence de la maladie.

Le consommateur n'apprécie pas encore vraiment la Sarpo Mira à cause de la couleur blanc/jaune de sa chair, de son côté un peu farineux et de ses tubercules un peu moins lisses (pelure rouge pâle, forme un peu cabossée). La pomme de terre est adéquate pour les frites, les flocons, les granulés et la purée. McCain utilise la Sarpo Mira exclusivement pour ses frites bio.

www.avevewinkels.be

Résistance durable

Les résistances simples au *Phytophthora* ne sont pas durables. Tôt ou tard, le *Phytophthora* les surmontent ou passent à travers et les variétés avec cette résistance simple perdent une grande partie de leur valeur. La combinaison des deux gènes de résistance différents est déjà beaucoup plus durable. Il devient non pas deux fois, mais plusieurs fois plus difficile pour le *Phytophthora* de passer outre cette résistance. Une résistance triple est encore beaucoup plus durable.

La résistance la plus durable est obtenue lorsque les variétés de pommes de terre avec plusieurs résistances sont alternées dans l'espace et le temps. Les scientifiques sont convaincus qu'avec un tel scénario, et quelques pulvérisations, les problèmes de *Phytophthora* devraient bientôt appartenir au passé, parce que le *Phytophthora* n'a aucune possibilité de s'adapter dans ce cas-là.

La pomme de terre Fortuna de BASF

BASF a réalisé le développement le plus avancé en matière de pommes de terre génétiquement modifiées résistantes au *Phytophthora*. L'entreprise a créé la pomme de terre 'Fortuna'. Cette pomme de terre est mûre pour le marché. Elle comporte deux gènes de résistance, le *Rpi-blb-1*, et le *Rpi-blb-2*. La combinaison de ces deux gènes rend la résistance de cette pomme de terre plus durable que celle des variétés Bionica et Toluca. La pomme de terre Fortuna comporte également un marqueur de sélection sous forme de gène muté AHAS. Ce gène muté AHAS donne une tolérance aux herbicides à base de sulfonylurée. BASF a acheté la licence de deux gènes de résistance à une entreprise détenant les droits de propriété originaux pour l'utilisation de ces gènes.

BASF ne communique pas officiellement à ce sujet, mais d'après différentes sources, la pomme de terre Fortuna serait dérivée de la variété Agria, cultivée à grande échelle dans de nombreux endroits en Europe, et qui présente de bonnes propriétés pour la production de frites.

Le projet de cisgénèse DuRPh

Le projet DuRPh a débuté aux Pays-Bas en 2006. DuRPh signifie **Duurzame Resistentie tegen Phytophthora** (résistance durable au Phytophthora). Il s'agit d'un projet de 10 ans, financé par les autorités néerlandaises et qui a pour but d'identifier les gènes de résistance, de les caractériser, de créer des lignées de pommes de terre génétiquement modifiées et de les tester, et de communiquer les résultats au grand public. L'objectif final est d'aboutir à un "proof of principle" pour la résistance durable à cette maladie. Le projet se déroule dans une véritable perspective de durabilité et tient compte des aspects économiques, écologiques et sociaux. Wageningen UR est l'initiateur et le réalisateur du projet DuRPh.

Dans le cadre du projet DuRPh, des pommes de terre génétiquement modifiées sont créées avec une pensée spécifique. Les chercheurs utilisent la technique de la modification génétique, et le résultat final est soumis à la législation sur les OGM, mais les plantes créées sont aussi proches que possibles des plantes obtenues par amélioration conventionnelle. Cette approche s'appelle la *cisgénèse*, et signifie, en pratique que :

- (1) Les gènes de résistance proviennent de *Solanaceae* avec lesquelles la pomme de terre peut se croiser naturellement.
- (2) Les gènes de résistance ne sont pas manipulés. Ils sont introduits avec leurs signaux de régulation naturels.
- (3) Les lignées finales ne comportent pas de marqueurs de sélection, mais uniquement des cisgènes.

Dans les premières phases de développement, les chercheurs travaillent encore avec des constructions comportant un marqueur, simplement parce que c'est plus facile et que cela prend moins de temps, et que cette technique permet de savoir plus rapidement quels gènes et combinaisons produisent une bonne résistance durable.

Wageningen UR réalise depuis 2006 des essais à petite échelle en champ avec des lignées de pommes de terre génétiquement modifiées résistantes au *Phytophthora* à différents endroits aux Pays-Bas. Dans ces essais en champ, les différentes lignées présentant une (bonne) résistance dans les études en serre sont soumises à un premier test de réalité. Au fil des ans, différentes constructions et lignées sont ainsi testées. Il existe des pommes de terre avec des

résistances simples, doubles, triples, et des lignées avec (transgéniques) et sans marqueur de sélection (cisgéniques).

www.durph.nl

La cisgénèse fait l'objet de discussions législatives au niveau européen

La cisgénèse est une modification génétique, cela ne fait aucun doute. Mais la question de savoir si la cisgénèse doit ou non rester soumise à la législation européenne en matière d'OGM ou si elle doit en être exemptée fait débat. La législation existante prévoit déjà certaines exceptions. La mutagénèse classique, par exemple, entre dans la catégorie de la modification génétique, mais elle n'est pas assujettie à la législation européenne en matière d'OGM. Un groupe de travail technique se penche sur la question de savoir s'il y a des raisons fondées de maintenir la cisgénèse sous la législation OGM ou non. Le groupe de travail n'étudie pas uniquement la cisgénèse, mais aussi d'autres méthodes modernes pour modifier l'ADN, dont le 'reverse breeding', et le 'targeted DNA repair'.

Les pommes de terre génétiquement modifiées résistantes au *Phytophthora* ne menacent pas l'environnement

Les plantes génétiquement modifiées ne peuvent pas avoir de conséquences négatives pour l'environnement, comme par exemple l'évincement de certaines espèces dans la nature ou la perturbation d'équilibres naturels fragiles. Les pommes de terre génétiquement modifiées résistantes au *Phytophthora* possèdent des gènes de résistance présents naturellement dans les *Solanaceae* sauvages à tubercules. Des gènes identiques ou comparables sont également présents dans les pommes de terre rendues résistantes au *Phytophthora* par amélioration conventionnelle. Les gènes dans les lignées de pommes de terre génétiquement modifiées sont donc aussi sûrs pour l'environnement que ces mêmes gènes dans les variétés améliorées conventionnelles et dans les variétés sauvages. L'affaire est-elle close pour autant ? Pas du tout. Car il n'est pas du tout exclu que la modification génétique entraîne des phénomènes inattendus ayant un effet sur la survie du plant de pomme de terre dans la nature, ou entraînant d'autres modifications inattendues des caractéristiques de la plante. C'est pour cette raison que des sélections strictes sont effectuées dans le cadre de la recherche de lignées génétiquement modifiées adéquates, afin de ne sélectionner que les lignées ayant conservé les bonnes caractéristiques de la variété. Dans les essais sur champ, l'aspect extérieur et le comportement des plantes sont également étudiés en détail, afin de détecter les éventuelles

anomalies, et vérifier si celles-ci peuvent éventuellement avoir des conséquences négatives. Les plantes aux caractéristiques indésirables ne sont pas commercialisées.

La pomme de terre n'existe pas à l'état sauvage en Europe. Elle n'a pas non plus de membres de sa famille avec lesquels elle pourrait se croiser. La morelle noire est la plus proche, en termes phylogénétiques, de la pomme de terre, mais les deux ne peuvent pas se croiser. La pomme de terre de culture est en outre une plante fortement domestiquée qui ne s'établit pas spontanément dans la nature. Elle n'a pas assez de pouvoir concurrentiel par rapport aux plantes sauvages. Concrètement, cela signifie que ni les pommes de terre génétiquement modifiées ni la caractéristique génétiquement modifiée ne peuvent se fixer dans notre environnement. La pomme de terre ne se présente que sous forme de drageon sur les parcelles où elle est cultivée, et dans de la terre provenant des parcelles où elle est cultivée. Mais il s'agit toujours d'une présence temporaire.

La sensibilité alimentaire des pommes de terre génétiquement modifiées résistantes au *Phytophthora*

Les pommes de terre génétiquement modifiées résistantes au *Phytophthora* comportent des gènes de résistance identiques ou comparables à ceux des pommes de terres résistantes au *Phytophthora* traditionnelles. Un exemple concret: la pomme de terre génétiquement modifiée Fortuna de BASF et les variétés de pommes de terre obtenues par amélioration conventionnelle, Bionica et Toluca, possèdent toutes les trois le même gène *Rpi-blb-2*. Dans le cas des pommes de terre génétiquement modifiées, il faut démontrer que le produit génétique créé par le gène de résistance est sûr, qu'il n'est pas toxique et qu'il n'entraîne pas de réactions allergiques. Ce n'est pas nécessaire pour le même gène dans un variété ayant fait l'objet d'une amélioration conventionnelle comme la Bionica ou la Toluca. Celles-ci peuvent être commercialisées sans contrôle de leur sécurité alimentaire. Et cela malgré le fait que le gène *Rpi-blb2* dans ces plantes soit entouré de centaines de gènes issus des variétés sauvages.

Ainsi que nous l'avons dit plus tôt, il n'est pas exclu que la modification génétique puisse entraîner des effets secondaires inattendus. La mutagénèse par insertion, la pléiotropie et la variation somaclonale sont citées comme des causes possibles d'effets secondaires. Pour ces raisons, une pomme de terre génétiquement modifiée résistante au *Phytophthora* doit subir des tests supplémentaires. La composition de la pomme de terre doit ainsi être comparée à celle des pommes de terre conventionnelles et les quantités des principaux composants de la pomme de terre doivent être mesurés et comparés. L'OCDE a déterminé quelles substances doivent être analysées. La pomme de terre contient naturellement des glyco-alcaloïdes toxiques. C'est à cause d'eux qu'il faut peler les pommes de terre pour pouvoir les manger en toute sécurité. La pomme de terre comporte également des substances qui bloquent nos enzymes digestives. Les pommes de terre crues donnent mal au ventre : c'est pour cela que nous les cuisons avant de les consommer. L'analyse obligatoire permet de mesurer précisément les quantités de ces substances car il faut éviter coûte que coûte de commercialiser des

pommes de terre comportant trop de substances toxiques. La quantité de glyco-alcaloïdes de toute nouvelle variété est contrôlée avant de la commercialiser, qu'elle soit génétiquement modifiée ou non. Aux Pays-Bas et en Suède, une teneur totale en glyco-alcaloïdes de 200 mg/kg est autorisée comme limite de sécurité supérieure. D'autres pays européens n'appliquent pas de normes pour les glyco-alcaloïdes.

Si l'analyse démontre que la composition de la pomme de terre génétiquement modifiée présente une quantité anormale de certaines substances, des tests supplémentaires doivent être effectués, le plus souvent sous forme d'essai alimentaire de 90 jours chez les rats.

OCDE, Consensus Document on the Biology of *Solanum tuberosum* subspecies *tuberosum* (potato)

La pomme de terre génétiquement modifiée résistante au *Phytophthora* n'est pas encore commercialisée

La pomme de terre génétiquement modifiée résistante au *Phytophthora* Fortuna de BASF est arrivée à un stade avancé de développement, mais elle n'est pas encore commercialisée. BASF doit encore introduire une demande auprès de la Commission européenne. Et une fois que le dossier est introduit, il faut encore plusieurs années avant que la procédure ne parvienne à terme. Il n'y a aucune certitude, mais on peut estimer qu'il faudra encore attendre jusqu'en 2013 au moins pour qu'une pomme de terre génétiquement modifiée résistante au *Phytophthora* soit vendue sur le marché. Les autres lignées en développement sont moins avancées que la Fortuna et se feront attendre plus longtemps.