

## **GENOMIQUE ET PRODUCTION NON ALIMENTAIRE Acides gras d'intérêt industriel obtenus par génie génétique**

### **Genomics and Industrial Production Engineering of fatty acid metabolism for industrial uses**

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 9, Numéro 2, 143-9, Mars - Juin 2002, Dossier : Génomique et filière oléagineuse - Journées Chevreul de l' AFECG, Paris, 21-22 novembre 2001

**Auteur(s)** : René LESSIRE, Laboratoire de biogenèse membranaire, CNRS UMR 5544, Université Victor-Segalen, Bordeaux 2, 146, rue Léo-Saignat, Case 92, 33076 Bordeaux Cedex, France.

**Author(s)** : René LESSIRE

**Résumé** : La caractérisation de mutants de plantes déficients pour la synthèse de lipides, l'évolution des techniques de la biologie moléculaire et le séquençage de la totalité du génome d'*Arabidopsis thaliana* sont des éléments qui ont rendu possible la manipulation par voie génétique de la composition en acides gras des huiles végétales. Parmi les enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras et des triacylglycérols, les acyl-ACP thioestérases, les désaturases, les hydroxylases, les transacylases et les élongases sont des protéines stratégiques pour la modification du profil des acides gras des huiles végétales. Il est effectivement possible de diminuer la longueur moyenne de la chaîne carbonée des acides gras de colza par l'introduction du gène codant pour l'acyl-ACP thioestérase de la baie de Californie. L'huile issue de colza génétiquement modifiée présente un taux de 50 % en C12. Ce taux a été fortement augmenté par croisement avec une variété modifiée par le gène codant pour la lyso-acide phosphatidique acyltransférase (LPAAT) de noix de coco. L'introduction ou la suppression d'une insaturation dans la chaîne carbonée d'un acide gras a également été réalisée. La transformation par le gène anti-sens de la stéaroyl-ACP désaturase a permis de créer des variétés de colza dont l'acide gras majoritaire est le C18:0. De même, des variétés de soja produisant de l'huile enrichie en acide oléique ou linoléique ont été obtenues respectivement par inactivation des gènes des DELTA12 et DELTA15 désaturases. La position de l'insaturation peut être également modifiée. Une huile riche en acide pétrosélinique (C18:1, DELTA6) résulte de l'introduction du gène de la palmitoyl-ACP DELTA4 désaturase de coriandre et de la stéaroyl-ACP DELTA9 désaturase en anti-sens. Enfin, de l'huile de colza riche en acides polyinsaturés a été obtenue par croisement de colza modifié par introduction des gènes de DELTA6 et DELTA12 désaturases de *Mortierella alpina*. Une huile de colza à haute teneur en acide érucique est en cours d'élaboration ; pour y parvenir l'introduction du gène de la LPAAT de *Limnanthes alba* est nécessaire. Le colza obtenu est capable de synthétiser de la tri-érucine mais la teneur en acide érucique n'est que faiblement augmentée. Enfin, il est possible de modifier par ingénierie génétique les propriétés des désaturases et des thioestérases, laissant présager la possibilité de faire de l'huile à façon. Les limites de ces modifications de la composition en acides gras des huiles par génie génétique seront également présentées.

**Summary** : The manipulation of plant fatty acid metabolism in such ways as to produce new valuable vegetable oils has recently increased. A number of factors such as new molecular biology technologies, lipid-deficient mutant characterizations and the complete sequencing of the *A. thaliana* genome have all converged to make engineering fatty acid metabolism particularly attractive. The main targets involved in the different genetic manipulations concerned are the genes encoding the

enzymes involved in the triacylglycerol pathways: acyl-ACP thioesterase, desaturases, transacylases, elongases, and hydroxylases. These genes are used in the different processes to modify the chain length, the unsaturation degree and the double-bound position of the carbon chain of fatty acid. The engineering of oilseeds for industrial uses and human food has been successfully achieved. One of these successes has been a transgenic rapeseed able to produce oil containing up to 90% of lauric acid obtained by introducing genes from foreign plants. The increase of the saturated fatty acid content of oilseed by genetic manipulation has also been equally achieved, soybean and rapeseed with high stearate content have been obtained. The production of unusual fatty acids such as polyunsaturated, epoxy, hydroxy, acetylenic, petroselinic and erucic from common crops are also in progress. Finally, metabolism studies using a high laurate rapeseed line show that manipulations of the lipid biosynthesis pathways have limitations and, as a consequence, new strategies are being elaborated.

**Mots-clés** : oléagineux, biotechnologie des lipides, métabolisme lipidique, acides gras, désaturase, thioestérase, hydroxylase, transacylase, élongase.

**Keywords** : oleaginous crops, lipid biotechnology, lipid metabolism, fatty acids, desaturase, thioesterase, hydroxylase, transacylase, elongase.

#### ARTICLE

L'énergie, la densité énergétique que doit contenir la ration alimentaire pour permettre à l'animal de se développer de façon satisfaisante constitue l'une des contraintes les plus coûteuses dans la formulation d'aliments composés. Cette énergie est apportée par les différents ingrédients rentrant dans la formulation de l'aliment. C'est la raison pour laquelle, aussi bien pour les céréales que pour les tourteaux<sup>1</sup>, les industriels des aliments composés demandent aux sélectionneurs, créateurs de nouvelles variétés, de prendre en compte ces attentes qualitatives et de diminuer, dans les matières premières agricoles, les composés peu ou pas digestibles, voire anti-nutritionnels.

#### **Amélioration de la valeur énergétique des tourteaux par réduction des teneurs en fibres**

Cellulose, hémicellulose, lignines<sup>2</sup> représentent 40 à 50 % du contenu du tourteau, ces constituants biochimiques (*dietary fibre*, chez les anglo-saxons) sont en partie digérés par le porc mais pas du tout par les volailles. La première voie d'amélioration de la valeur d'usage des tourteaux est donc la diminution en proportion de ces fractions peu ou pas digestibles.

#### *Décorticage des graines de tournesol*

Dans le tournesol, la coque représente presque 25 % de la graine, le décorticage avant trituration permet de produire un tourteau plus concentré en protéines (gain de 10 points) et en énergie, par diminution des parties cellulosiques.

La variabilité génétique sur l'aptitude au décorticage exprimée en pourcentage de coques extraites est importante, de quelques pour cent à 100 % sur les lignées, de 15 à 75 % sur les variétés cultivées. Cette caractéristique technologique n'est pas corrélée négativement à la teneur en huile ou en protéines de l'amande (*figures 1 et 2*).

### *Dépelliculage de la graine de colza*

L'Interprofession française des oléagineux a mis au point un procédé de dépelliculage de la graine de colza avant trituration ; malgré les gains sur la valeur énergétique globale, la teneur et la digestibilité de l'azote (*tableau 2*), ce procédé ne s'est pas développé industriellement car les coûts de réalisation sont supérieurs aux gains qualitatifs obtenus sur le tourteau.

### *Diminution du contenu en lignine, les graines jaunes de colza*

La recherche universitaire canadienne a beaucoup travaillé sur les variations des profils nutritifs des tourteaux issus de graines jaunes et brunes dans les espèces *Brassica napus*, *B. juncea*, *B. rapa*, *B. carinata*. D'une manière générale, la comparaison des deux types de graines jaunes et brunes montre que les farines déshuilées issues de graines jaunes contiennent plus de protéines (44,5 % *versus* 42,7 %), plus de saccharose (8,7 % *versus* 7,5 %), et moins de *dietary fibre* (27,7 % *versus* 33,6 %) [1].

Il est intéressant de noter que la diminution de la teneur en fibres résulte principalement d'une diminution des teneurs en lignine, le contenu en cellulose et hémicellulose restant constant. Cela signifie que dans ces génotypes à graines jaunes, ce sont les voies métaboliques des synthèses des polyphénols qui ont été modifiées. Les travaux actuels de génomique sur le colza permettront demain de mieux connaître ces voies métaboliques et donneront aux sélectionneurs les outils pour intervenir directement au niveau des gènes impliqués.

### *Diminution du contenu en fibres, taille des graines*

Des travaux danois [2] ont montré que cellulose, hémicellulose et lignine étaient principalement localisées dans les parties extérieures de la graine et que les calibres supérieurs à 1,75 mm présentaient des teneurs diminuées en lignine et en fibres (*tableau 3*).

Des mesures de digestibilité apparente et de performance de croissance des poulets nourris avec deux variétés de colza à grosses ou petites graines, ont montré (*tableau 4*) que les performances sont meilleures avec les grosses graines (indice de consommation plus faible et croissance supérieure).

### **Amélioration valeur de la protéique des tourteaux par augmentation de la teneur en acides aminés indispensables**

Les acides aminés sont non seulement les constituants unitaires des protéines, mais aussi les précurseurs à la formation de divers métabolites secondaires : hormones, cofacteurs, alcaloïdes. Vingt acides aminés différents permettent la mise en place de ces voies métaboliques et neuf d'entre eux dits « acides aminés essentiels », indispensables, doivent être trouvés dans l'alimentation des animaux et des humains.

Sur le critère « protéines », les industriels des aliments composés reprochent aux tourteaux européens de colza et de tournesol leurs teneurs plus faibles en protéines, par comparaison avec le soja et, pour l'ensemble des tourteaux, des teneurs en acides aminés soufrés (méthionine, cystéine), qu'il faudrait améliorer pour limiter la complémentation au niveau des formulations, surtout en volailles.

Des travaux de transgénèse menés au Japon ont montré que la modification des proportions napine/cruciférine sur le colza, augmentait les teneurs en méthionine, cystéine, lysine. Des résultats

analogues ont été obtenus par d'autres laboratoires par l'expression de protéines recombinantes riches en acides aminés soufrés ; 15 kd zéine du maïs, albumine 2 S de la noix du Brésil, albumine du tournesol... [3-5].

Tous ces travaux intéressants par leurs résultats sur l'augmentation générale de la teneur en protéines et en certains acides aminés, doivent être revus et ré-appréciés. En effet, on ne raisonne plus à présent en taux protéiques, mais en disponibilité en acides aminés. Le calcul de la satisfaction des besoins en acides aminés avec un apport optimisé suivant l'animal, son âge, permet de réduire les risques de gâchis en protéines et les conséquences sur les rejets.

L'industrie des acides aminés de synthèse a bien compris cette évolution et offre aujourd'hui aux formulateurs européens, lysine (150 000 tonnes par an), méthionine (70 000 tonnes), thréonine et tryptophane à des prix de plus en plus compétitifs et qui doivent faire réfléchir les sélectionneurs avant qu'ils ne se lancent dans des programmes d'amélioration des matières premières agricoles sur ces axes protéines et acides aminés.

### **Amélioration de la valeur d'usage des tourteaux par diminution des composés anti-nutritionnels**

#### *Raffinose - Stachyose*

Ces oligo-saccharides, que l'on retrouve dans de nombreuses graines et qui jouent un rôle de réserve d'énergie au moment de la germination, sont très faiblement métabolisés par des mammifères mono-gastriques et provoquent des flatulences chez ces animaux, diminuant ainsi le potentiel énergétique des tourteaux.

Sur le soja, les gènes *stc 1a* et *stc 1b*, impliqués dans la synthèse de ces oligo-saccharides, ont été caractérisés [6]. Les formes mutantes ont permis de diminuer de façon importante le taux de stachyose dans les graines (*tableau 5*), mais ces génotypes présentent de gros problèmes de germination.

#### *Acide phytique et phytate*

L'acide phytique, ou acide myo-inositol hexaphosphorique, est composé d'une structure inositol (polyol cyclique) estérifiée par six radicaux phosphate. De par sa structure moléculaire, l'acide phytique a une teneur élevée en phosphore (26,2 %) et dans la graine, 2/3 à 3/4 du phosphore est sous forme phytique (*tableau 6*).

À l'inverse de sa forme minérale dont la digestibilité est satisfaisante, le phosphore sous forme phytique n'est pas biodisponible pour les monogastriques par absence d'activités phytasiques, naturellement présentes dans le système digestif de ces animaux.

Deux voies d'amélioration s'offrent aux sélectionneurs :

- la recherche par mutagenèses induites de génotypes *low phytic acid*. Les premiers résultats montrent des réductions de 20 à 70 % en acide phytique, sans limitation du phosphore total [7], mais des problèmes agronomiques sur ces génotypes ;

- l'expression d'une activité phytasique microbienne dans des oléagineux transgéniques [8]. Au moment du broyage de la graine, la phytase est mise en contact avec son substrat, l'acide phytique, rendant le phosphore disponible pour l'animal.

#### *Diminution des teneurs en glucosinolates*

Les glucosinolates sont des molécules soufrées qui appartiennent au métabolisme secondaire, avec leurs dérivés de dégradation, isothiocyanates, les glucosinolates sont connus depuis longtemps pour leurs propriétés fongicides, bactéricides, nématocides, allélopathiques, et plus récemment, pour leurs propriétés de prévention de certains cancers.

En alimentation animale la présence, en particulier du 2 hydroxy-3 butényl glucosinolate (progoitrine), provoque des problèmes au niveau de la thyroïde, du foie et des reins avec des conséquences sur la croissance et la fécondité des animaux.

Dans les années 1980, des cultivars à faible teneur en glucosinolates ont été sélectionnés en Europe et au Canada, faisant baisser ces teneurs de 80 %. Les variétés actuelles oscillent entre 10 et 15 micro-moles par gramme de graines, seuils où les effets sur la thyroïde et l'hypertrophie du foie ne sont plus révélés.

#### **Modification du profil en acides gras et utilisation de graines entières**

Pour certaines formules où l'industriel recherche une énergie concentrée, des graines entières d'oléagineux sont utilisées pour la formulation de l'aliment ; le profil en acides gras de ces graines va avoir des conséquences sur la composition des graisses des animaux et sur la tenue du gras des carcasses.

Les acides gras saturés, mono-insaturés, poly-insaturés sont les constituants naturels des graisses animales et végétales et, chez ces derniers, deux types sont majoritaires : les mono-insaturés avec, comme chef de file, l'acide oléique (C18:1 n-9 ), et les poly-insaturés avec respectivement, l'acide linoléique ( C18:2 n-6) et l'acide linoléique (C18:3 n-3).

Les proportions en ces différents acides gras vont avoir des conséquences sur la qualité des gras des animaux et pour certaines formules, porc charcutier par exemple, des contraintes de teneurs maxima en C18:2 sont appliquées, limitant ainsi la possibilité d'incorporation de matière première trop riche en cet acide gras.

Cependant, le sélectionneur sait intervenir sur ces différentes voies de biosynthèse, des mutants oléiques existent chez le tournesol, le maïs, l'enrichissement en saturés (acide stéarique) a été réalisé chez le soja. Des profils en acides gras « à la carte » existent dans les pépinières des sélectionneurs. Quel intérêt ?

Question difficile mais ne pas oublier que, dans une formulation aliment, pratiquement toutes les matières premières sont interchangeables.

## CONCLUSION

L'objectif des industriels des aliments composés est de fournir à leurs clients éleveurs, des formules permettant d'optimiser les performances des animaux, et ce, avec un minimum de coûts supplémentaires.

L'amélioration des plantes et des oléagineux en particulier a d'abord fait progresser les variétés sur des critères agronomiques - rendement, résistance aux maladies - critères qui restent et resteront prioritaires.

En profitant du potentiel de variabilité génétique existant chez les oléagineux et des premiers résultats de la génomique, il serait sûrement possible de faire beaucoup plus. Cependant, le frein est économique et concerne la valorisation.

Quelle valorisation, quel retour sur investissement pour l'introduction de critères qualité « alimentation animale » sur les oléagineux européens, qui sont d'abord des sources d'huile, avec une huile deux à trois fois mieux valorisée qu'un tourteau ?

Quelle valorisation pour un tourteau d'oléagineux amélioré, quand on sait que, dans une formulation, la majorité des ingrédients sont interchangeable et que la complémentation avec des sources industrielles de protéines, de matières grasses, de vitamines, d'enzymes à faible coût est toujours possible ?

Cela est un constat pour aujourd'hui. Mais pour demain, la production agricole doit avoir en perspective deux grands défis : celui de l'environnement et celui de la sécurité sanitaire.

Les programmes d'action sur les nitrates, le suivi régulier des produits phytosanitaires dans les eaux, l'enjeu du phosphore vont se traduire par une obligation de résultats sur le moyen terme.

Le défi de la sécurité sanitaire se traduira par le développement de démarches « assurance qualité », de traçabilité, de transparence, de simplification au niveau de la production agricole et des entreprises.

Ces dimensions qualitatives sont peut-être une chance pour nos productions nationales et toutes améliorations des matières premières agricoles visant à relever ces défis peuvent sûrement modifier pour demain, l'analyse qui aujourd'hui, peut être jugée pessimiste.

Notes :

<sup>1</sup> L'Union européenne consomme chaque année 40 millions de tonnes de tourteaux d'oléagineux : une majorité en soja (28 millions de tonnes), 5 millions de tonnes en colza, 3 millions de tonnes en tournesol, le solde en lin, coton, coprah et palmiste.

Le tourteau est une graine d'oléagineux dont on a retiré l'huile. Sa composition varie en fonction du type de graine (*tableau 1*).

<sup>2</sup> La lignine n'est pas un poly-saccharide, mais un polymère phénolique à structure réticulée non cristalline.

## REFERENCES

1. SIMBAYA J, SLOMINSKY B, BAKOW G, CAMPBELL L, DOWNEY RK, BELL JM (1995). Quality characteristics of yellow-seeded *Brassica* seed meal: protein, carbohydrates and dietary fiber components. *J Agric Food Chem*, 43 : 2062-6.
2. JENSEN SK, YONG-GANG LIU, EGGUM BO (1995). The influence of seed size and hull content on the composition and digestibility of rapeseeds in rats. *Animal Feed Science and Technology*, 54 : 9-19.
3. ALTENBACH SG, KUO CC, STARACI LC, *et al.* (1992). Accumulation of a Brasil nut albumin in seeds of transgenic Canola results in enhanced levels of seed proteins methionine. *Plant Mol Biol*, 18 : 235-45.
4. HOFFMAN LM, DONALDSON DD, BOOKLAND R, *et al.* (1987). Synthesis and protein body of maize 15 kd zein in transgenic tobacco seed. *EMBO J*, 6 : 3213-21.
5. LILLEY GG, CALDWELL JB, KORTT AA (1989). *Isolation of primary structure for a novel methionine-rich protein from sunflower seeds (Helianthus annus L.)*. Proceedings of the world congress on vegetable protein utilization in human foods and animal feedstuffs, 487-502.
6. KERR PS, SEBASTIAN SA (1998). Soyabean products with improved carbohydrate composition and soyaplants. *US Patent* 5 710 365.
7. WILCOX JR, PREMACHANDRA GS, YOUNG KA, RABOY V (2000). Isolation of high seed inorganic P, low phytate soyabean mutants. *Crop Sci* 40 : 1601-5.
8. PEN J, VERWOERD TC, VAN PARIDON, *et al.* (1993). Phytase containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. *Bio/Technology*, II : 811-4.

## Illustrations

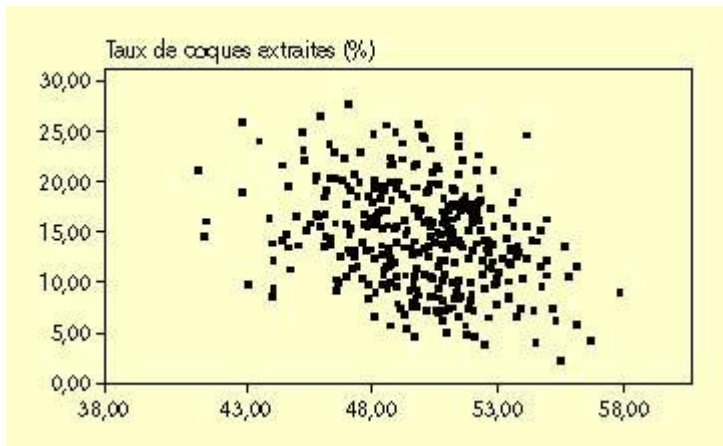


Figure 1. Relation teneur en MG des graines décortiquées et taux de coques extraites.

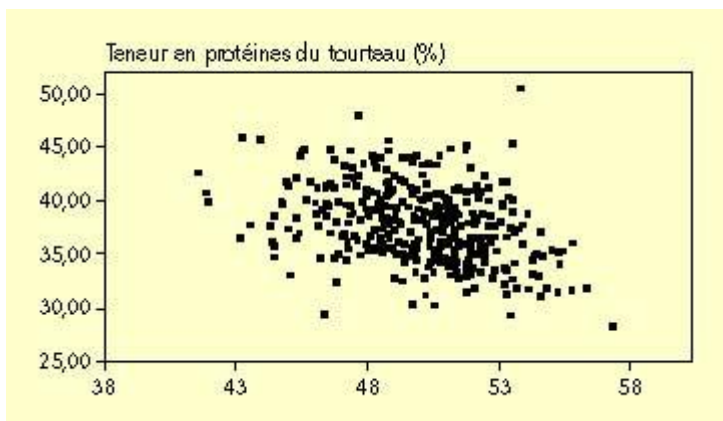


Figure 2. Relation teneur en MG des graines décortiquées et teneur en protéines du tourteau

Tableau 1. Composition moyenne des tourteaux colza/tournesol en % de la matière sèche.

	Protéines	Cellulose hémicellulose	Lignines	Cen dres	Lipides	Eau
Tourteau de colza	35	32	12	7	2	12
Tourteau de tournesol	29	40	10	7	2	12



Produit testé	Teneur en MAT (% MS)	Teneur en CB (% MS)	Énergie digestible porcs (Kcal/kg MS)	Coefficient d'utilisation digestive de l'azote fécal	Digestibilité iléale des acides aminés
Tourteau de colza	36 à 42	10 à 14	3 000 à 3 300	80 %	
Tourteau de colza dépelliculé	43 à 50 soit + 15 à + 20 %	6 à 8,4 soit - 40 %	3 700 soit + 20 %	87 %	- pas d'effet sur digestibilité de la méthionine - amélioration de la digestibilité de la lysine, de l'histidine et de la cystine
Tourteau de soja	52	6	4 000	+/- 90 %	

Tableau 2. *Dépelliculage de graines de colza (essais porcs - synthèse travaux Cetiom, Gerdoc et Inra).*

Description et composition chimique des graines distribuées aux poulets (g/kg de MS)									
Colza	Échantillon	Taille graine (mm)	Poids graine (mg)	Protéine	Lipide	Lignine	Fibres insolubles	Fibres totales	Gluco. $\mu$ moles/g
A	Petite	< 1,75	3,6	234	478	52	148	178	6,3
	Grosse	> 1,75	4,9	250	480	45	145	179	7,1
B	Petite	< 1,75	4,1	206	495	61	157	187	4,8
	Grosse	> 1,75	5,3	196	513	57	147	170	5,6

Tableau 3. *Taille des graines de colza (source : Sk. Jensens, Danemark).*

Taille graine*	Obs.	Digestibilité apparente en %				Performances de croissance	
		MS	Énergie	Protéine	Graisse	Croissance en g	Indice de conso.
Petite	18	74,3 <sup>a</sup>	75,8 <sup>a</sup>	67,9 <sup>a</sup>	70,7 <sup>a</sup>	613	2,06 <sup>a</sup>
Grosse	18	77,1 <sup>b</sup>	79,6 <sup>b</sup>	69,5 <sup>b</sup>	78,6 <sup>b</sup>	655	1,90 <sup>b</sup>
	SD	2,29	2,35	2,29	4,04	67,5	0,13

Tableau 4. *Digestibilité apparente et performances de croissance (source : Sk. Jensens, Danemark).*

<sup>a</sup> et <sup>b</sup> significativement différents ( $p < 0,05$ ).

\* Petite : < 1,75 ; grosse : > 1,75.

Caractéristiques du tourteau de soja 48				
Tourteau de soja	Stachyose	Raffinose	Saccharose	Énergie métab. volailles (kcal/kg MS)
Normal	4,7 %	1,0 %	5,1 %	2 690
Modifié	1,3 %	0,4 %	7,0 %	3 000

Tableau 5. *Diminution des teneurs en sucres non digestibles du tourteau de soja.*

	Phosphore total (g/kg)	Phosphore phytique (% p total)	Phosphore disponible % p total
Blé	3,3	60-77	24
Mais	2,7	67	18
Orge	3,5	56-72	49
Lupin	4,0	50-60	20
Pois	4,2	40-50	35
Tourteau colza	10	60-73	22
Tourteau soja	6,5	60	15
Tourteau tournesol	9,0		17

Tableau 6. *Teneurs moyennes en phosphore total, phytique et disponible pour les volailles de quelques matières premières.*